Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Untersuchungen zum Gehalt energiereicher Phosphate und NAD im Herzvorhof bei Kaliumdepolarisation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Nikolaus Zeitler
aus
Osterburken

1986

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Siess

Untersuchungen zum Gehalt energiereicher Phosphate und NAD im Herzvorhof bei Kaliumdepolarisation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dipl. Biol. Nikolaus Zeitler
aus
Osterburken

1986

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. M. Siess
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H.-E. Hoffmeister

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Siess für die Überlassung des Themas und für die hilfreiche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Ich danke Frau Dr. U. Delabar und Frau A. Weible für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Dr. U. von Hees danke ich für die Erstellung eines Computerprogrammes zur Auswertung der Versuche, Herrn Ingo Teutsch danke ich für hilfreiche Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Material und Methoden	9
2.1.	Verwendete Substanzen	9
2.2.	Tiermaterial	10
2.3.	Präparation der isolierten Herzvorhöfe	10
2.4.	Methodik des Versuches	11
2.4.1.	Versuchsanordnung	11
2.4.2.	Verwendete Inkubationslösungen	11
2.4.3.	Versuchsdauer	14
2.5.	Aufarbeitung der Herzvorhöfe	15
2.6	Biochemische Analysen und Berechnungen	16
2.6.1.	ATP/CP-Bestimmung	16
2.6.1.1.	Prinzip der Reaktion	16
2.6.1.2.	Substanzen und Lösungen	17
2.6.1.3.	Versuchsansatz	18
2.6.1.4.	Berechnung des ATP/CP-Gehaltes	19
2.6.2.	ADP/AMP-Bestimmung	20
2.6.2.1.	Prinzip der Reaktion	20
2.6.2.2.	Substanzen und Lösungen	21
2.6.2.3.	Versuchsansatz	21
2.6.2.4.	Berechnung des ADP/AMP-Gehaltes	22
2.6.3.	NAD-Bestimmung	23
2.6.3.1.	Prinzip der Reaktion	23
2.6.3.2.	Substanzen und Lösungen	24
2.6.3.3.	Versuchsansatz	24
2.6.3.4.	Berechnung des NAD-Gehaltes	25
2.6.4.	Proteinbestimmung nach Lowry	25
2.6.4.1.	Prinzip der Bestimmung	25
2.6.4.2.	Substanzen und Lösungen	25
2.6.4.3.	Ansatz zur Bestimmung	26
2.6.4.4.	Eichkurve und Berechnung des Proteingehaltes	27
2.7.	Statistische Auswertung	29

Seite

3.	Ergebnisse	31
3.1.	Untersuchungen unter Normoxie, 30° C	31
3.1.1.	Inkubationsdauer 3 h, ohne Precursoren	31
3.1.2.	Inkubationsdauer 5 h, ohne Precursoren	34
3.1.3.	Inkubationsdauer 3 h, mit Precursoren	34
3.1.4.	Inkubationsdauer 5 h, mit Precursoren	37
3.2.	Untersuchungen unter Anoxie, 30° C	42
3.2.1.	Inkubationsdauer 3 h O_2 + 2 h N_2, ohne Precursoren	42
3.2.2.	Inkubationsdauer 3 h O_2 + 2 h N_2, mit Precursoren	46
4.	Diskussion	50
4.1.	Wirkung von Precursoren auf den Energiestoffwechsel	50
4.2.	Kaliumeinfluß auf den Energiestoffwechsel	54
4.3.	Schlußfolgerungen und Ausblick	58
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	73
8.	Abkürzungsverzeichnis	75

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Chirurgische "Eingriffe am offenen Herzen", das heißt Operationen bei temporärer Unterbrechung der Herzfunktion, stellen einen Kompromiß zwischen Anforderungen aus chirurgischer Sicht und der für die völlige Erholung der Herzfunktion lebenswichtigen Aufrechterhaltung sowohl des Energiestoffwechsels als auch der zellulären Integrität des Herzens dar. Für den Chirurgen sind eine schnelle Induktion, eine effektive Aufrechterhaltung und eine leichte Beendigung des Herzstillstandes, ein blutleeres Operationsfeld zur Darstellung des Befundes und ein genügend langer Zeitraum für ein ruhiges Arbeiten und optimale Operationstechnik erforderlich. Für das ischämisch stillstehende Herz sind Schutzmaßnahmen zu treffen, die es in der zum Teil recht langen Ischämiedauer von 60 Minuten vor irreversiblen Schädigungen bewahren.

Die heute angewandte Cardioplegie, oder genauer die kalte ischämische Cardioplegie, kann als eine Methode definiert werden, die durch Infusion einer kalten Lösung direkt in die Aortenwurzel oder die Coronararterien das Herz ruhigstellen und während der Ischämiedauer schützen soll. Die Entwicklung der Cardioplegie-Verfahren läßt sich in mehrere Abschnitte unterteilen, die durch unterschiedliche Lehrmeinungen und Praktiken charakterisiert sind. In der Zeit von 1955 - 1960 wurden nach Arbeiten von MELROSE et al. hochkonzentriete K^+-citrat-Lösungen bis zu 250 mmol/l K^+ verwendet, die jedoch so häufig zu Myocardnekrosen führten, daß die Methode der chemischen Cardioplegie wieder verlassen wurde. In den Jahren nach 1960 wurden von deutschen Wissenschaftlern andere Lösungen entwickelt, die Anfang der 70er Jahre klinisch eingeführt und allgemein anerkannt wurden. So untersuchte HÖLSCHER (1967) die cardioplegischen und protektiven Eigenschaften von Mg^{2+} und Procain-Lösungen, KIRSCH ent-

wickelte 1972 eine 161 mmol/l Mg-aspartat-Lösung, die 11 mmol/l Procain enthielt und in Kombination mit gemäßigter Hypothermie und oberflächlicher Kühlung des Herzens zur Cardioplegie weite Verbreitung fand. Eine dritte Forschungsgruppe um BRETSCHNEIDER entwickelte Grundprinzipien von Kombinationen vollständiger Myocardperfusion und Hypothermie zur chemischen Cardioplegie. Sie konnten den Einfluß der Temperatur cardioplegischer Lösungen auf energieverbrauchende Prozesse ventrikulärer Fibrillationen aufzeigen. Ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe wurde die Bedeutung des Gehaltes an ATP und CP im Herzen als Parameter für die Prognose der Herzerholung nach Ischämie aufgezeigt. In den 60er Jahren wurde eine Vielzahl an cardioplegischen Lösungen entwickelt, deren Charakteristika Na^+-arm (5 - 12 mmol/l), Ca^{++}-frei, Procain (7.4 - 11.0 mmol/l), Mg^{++} (1 - 2 mmol/l), K^+ (5 - 10 mmol/l) waren. Die Bretschneider-Cardioplegie war eine zweiphasische Methode, bei der einer Infusion von kaltem oxygenierten Blut mit Glukose und Procain-Zusatz eine Infusion mit reiner cardioplegischer Lösung folgte. In den 70er Jahren gewann die chemische Induktion des Herzstillstandes wieder internationales Interesse und wurde als die geeignetste chirurgische und metabolische Beeinflussung des Herzens akzeptiert.

GAY (1973) und ROE (1979) entdeckten die Anwendung von K^+ unter 40 mmol/l als sichere Methode zur Erzeugung eines sicheren Herzstillstandes wieder.

Von der Forschungsgruppe um BUCKBERG wurde 1978 Blut als Träger für hohe Kaliumkonzentrationen als vorteilhaftes Medium zur Erzeugung eines sichereren Herzstillstandes untersucht, Vorstellungen zur Vermeidung von Reperfusionsschäden nach Ischämie entwickelt sowie die Auswirkungen des Auswascheffektes cardioplegischer Lösungen durch kollateralen Blutfluß festgestellt. Ihre Überlegungen führten zur Anwendung von sogenannter "multidose cardioplegia", also der Anwendung cardioplegischer Lösungen in mehreren

Infusionsschüben.

Eine unblutige, aber oxygenierte cardioplegische Lösung wurde von BLEESE und DÖRING (1976) als Verbesserung der von KIRSCH entwickelten Infusionstechnik klinisch angewendet.

Aus den bisher dargestellten Entwicklungen ist ersichtlich, daß es sich bei der Cardioplegie um ein ziemlich heterogenes Verfahren sowohl hinsichtlich der angewandten Technik als auch in der Zusammensetzung der verwendeten Lösung handelt, mit einer Vielzahl von bisher nur wenig verstandenen Auswirkungen auf das Herz. Die Zusammensetzung solcher Lösungen wurde von vielen Chirurgen weniger nach gesicherten wissenschaftlichen Erkenntnissen als nach individuellen Vorstellungen bestimmt. Von manchen Operations-Teams unserer medizinischen Hochschulen und auch in anderen Ländern werden "nach Gutdünken" des Chirurgen auch heute noch K^+-Konzentrationen zwischen 15 und 100 mmol/l benutzt.

Von HEARSE und BRAIMBRIDGE wurde in den 70er Jahren der Einfluß einzelner Komponenten cardioplegischer Lösungen auf Herzstillstand, ihre Schutzfunktion für Energiestoffwechsel und zelluläre Integrität sowie ihre Bedeutung für die Erholung der Herzfunktion während der Reperfusionsphase am St. Thomas Hospital in London untersucht. Sie entwickelten eine Infusionslösung, die 1982 für den klinischen Gebrauch in den USA von der FDA zugelassen wurde. Auch die Arbeitsgruppe um BRETSCHNEIDER setzte ihre Forschungen über optimiertere Lösungen fort, und so ergeben sich heute mehrere grundsätzlich verschiedene Typen von cardioplegischen Lösungen, für die in Tabelle I je ein typischer Vertreter der Gruppe dargestellt ist. Sie lassen sich in Lösungen vom "intrazellulär-Typ", die wenig Na^+ und kein Ca^{++} und "extrazellulär-Typ"-Lösungen, die fast normale extrazelluläre Konzentrationen dieser Ionen enthalten, einteilen. Diesen Lösungen werden Substanzen zugesetzt, die das Herz ruhigstellen und vor den Auswir-

Tab.1 KLINISCH VERWENDETE CARDIOPLEGISCHE LÖSUNGEN

	Bretschneider 1980	St. Thomas Hosp. 1981	Kirsch 1972
Agentien	mmol/l	mmol/l	mmol/l
KCl	8	16	-
NaCl	15	110	-
$NaHCO_3$	-	10	-
$MgCl_2$	8	16	-
Mg-aspartat	-	-	161
$CaCl_2$	-	1.2	-
Procain-HCl	-	-	11
Mannitol	20	-	-
Sorbitol	-	-	247
Histidin	180	-	-
Histidin-HCl	15	-	-
Tryptophan	2	-	-
pH	7.2	7.8	5.8 - 7.0
Osmolarität mosm/Kg H_2O	280	285	463
	intrazellul. Typ	extrazellul. Typ	

kungen der Ischämie schützen sollen. Die dritte Gruppe von Lösungen beschränkt sich auf die Verwendung von Substanzen zur Ruhigstellung und zur Substratlieferung. Es lassen sich mehrere Grundprinzipien cardioplegischer Lösungen definieren, die in den unterschiedlichen Lösungen und Verfahren verschiedene Wertungen erfahren:

1. Chemisch induzierter Herzstillstand, um Energie durch schnellen diastolischen Stillstand zu konservieren. Dies geschieht bei Extrazellulärtyp-Lösungen durch mäßige K^+-Erhöhung (16 - 30 mmol/l) (BRAZIER, FOLETTE, JYNGE, 1981), eventuell unterstützt durch Mg^{++}-Erhöhung oder durch Lokalanästhetika, wie Procain (BRAIMBRIDGE, 1977). Bei Verwendung von Intrazellulärtyp-Lösungen wird das Herz teils durch Na^+ und Ca^{++}-Verarmung (BRETSCHNEIDER, 1980; KIRSCH, 1972; PREUSSE, 1980), teils durch K^+-Erhöhung (10 - 20 mmol/l) (PREUSSE, 1980; ROE, 1979), durch Mg^{++}-Zugabe (8 - 161 mmol/l) (BRETSCHNEIDER, 1980; KIRSCH, 1972; PREUSSE, 1980) oder durch Zusatz von Procain (KIRSCH, 1972; BRETSCHNEIDER, 1975) ruhiggestellt.

2. Hypothermie, um metabolische und degenerative Prozesse zu verlangsamen.

3. Chemische Schutzsubstanzen, um z. B. durch Substratgabe oder Pufferwirkung ungünstige zelluläre Veränderungen zu verhindern oder hinauszuzögern.

4. Membranstabilisierung zur Verhinderung deletärer Ionenflüsse, zur Vermeidung von Substratverlusten durch die Zellwand und zur Verhinderung des Zusammenbruchs von Na^+, K^+ und Ca^{++}-Pumpen.

5. Hyperosmolarität der Lösung, um intrazellulären Ödemen entgegenzuwirken.

Die weite Verbreitung von Kalium zur Depolarisation und zur Erzeugung eines sofortigen diastolischen Stillstandes sind durch leichte Handhabung, gute Steuerbarkeit und schnelle Beendigung des Herzstillstandes bedingt. Dem

stehen jedoch die komplexen Wirkungen von K^+ auf die Ionenflüsse durch die Zellmembran und in der Zelle selbst sowie der noch ungenügend bekannte Einfluß auf die Stoffwechselprozesse der Zelle gegenüber.

So wurde von STIELER, REICH und SIESS (1982) durch Erhöhung der extrazellulären K^+-Konzentration von 5.9 auf 35.9 mmol/l und damit Herabsetzung des Kaliumgleichgewichtspotentials auf -36 mV eine konzentrationsabhängige Steigerung des Ruhesauerstoffverbrauches um ca. 80 % beobachtet, die nicht auf eine Erhöhung der diastolischen Spannung des Herzmuskels zurückzuführen war (Tab. 2). Dieser Effekt ergab sich durch einen vermehrten Ca^{++}-Einstrom unter der Depolarisation und konnte durch Blokkade der "langsamen Ca^{++}-Kanäle" der Membran mit Nifedipin verhindert werden. Dieses einströmende Calcium diente offenbar als Aktivator der Atmungskette (CARAFOLI, 1975), während es nicht zu einer Aktivierung des Aktomyosin-Systems kam. Als mögliche Ursache des Sauerstoffmehrverbrauches kommt also das kontraktile System nicht in Betracht.

Es war nun Aufgabe dieser Arbeit, den Einfluß der Kaliumdepolarisation und die damit verbundene Aktivierung der Mitochondrienatmung auf den Energiehaushalt des Herzens zu untersuchen. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß Zugabe von Precursoren des Adenin- (AN) und Pyridinstoffwechsels (NAD) unter Normoxie zu einer verbesserten Funktion und erhöhtem AN- und NAD-Gehalt im Herzmuskel führten und unter Anoxie eine Schutzwirkung auf die anoxische Degradierung dieser für die Reperfusionsphase wichtigen Substanzen ausüben.

Durch Bestimmung des Gehaltes an energiereichen Phosphaten und NAD im Herzvorhof des Meerschweinchens sollte geklärt werden, ob die vermehrte Zellatmung mit der Bildung von Energieträgern des Zellstoffwechsels verbunden ist oder ob es unter Kalium-Depolarisation zu einer Ent-

K^+-Depolarisation, O_2-Consumption and Diastolic Tension in Resting Left Guinea Pig Atria at 5 mN Preload

K^+	5.9 •	10	20	30	60	100	150	200	mmol/l
RP	-83	-57	-45	-36	-20	-7	+3	+10	mV
O_2	100%	108	130	180	200	220	250	350	%
DT	5	5	5	5	5	5*	5*	5*	mN

1. RP = Calculated Resting Potential
2. O_2 = Consumption in %
3. DT = Diastolic Tension 5 mN (500 mp)
4. DT* = Increased Diastolic Tension (Contracture) with high External Ca^{++} or with Isotonic Low Na^+ and high Ca^{++}

Tabelle 2 (zusammengestellt nach Stieler, Reich und Siess 1982 ; Siess und Stieler 1984)

Erhöhung der KCl-Konzentration um 10 bis 60 mmol/l führt zu einem nicht linearen Anstieg des Ruhe O_2-Verbrauchs (100 %) auf 108 bis 200 %. Dieser Anstieg kann durch Nifedipin verhindert werden, während der Anstieg über 100 mmol/l KCl nicht mehr durch Nifedipin beeinflusst wird. Hier treten bei niedriger Na^+- und/oder hoher Calcium-Konzentration der K.H.-Lösung Kontrakturen mit Erhöhung der diastolischen Spannung auf.

kopplung der Atmungskette von der oxidativen Phosphorylierung und damit zu einer Verschlechterung des energetischen Nutzeffektes kommt. Dies kann zu einer Stoffwechselbelastung der Zelle führen, die dann gerade, z. B. bei Syntheseleistungen durch zusätzlichen Verbrauch von Energiereserven, die Erholungsfähigkeit des Gewebes verschlechtert. Außerdem sollte die Energiebelastung des Herzens unter Anoxie bei optimaler anaerober Glykolyse unter ansteigenden extrazellulären K^+-Konzentrationen untersucht werden, um prognostische Hinweise zur Zellerholung in Abhängigkeit von der Kalium-Belastung zu erhalten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Substanzen

Adenin	Merck, Darmstadt
ADH	Böhringer, Mannheim
ADP	Böhringer, Mannheim
ATP	Böhringer, Mannheim
Creatin	Merck, Darmstadt
Creatinkinase	Böhringer, Mannheim
Folin-Phenol-Reagenz	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Böhringer, Mannheim
Hexokinase	Böhringer, Mannheim
Kaliumkarbonat p.a.	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat x 4 H_2O	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat x 5 H_2O p.a.	Merck, Darmstade
Laktat-Dehydrogenase	Böhringer, Mannheim
Magnesiumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Methylorangeindikator	Merck, Darmstadt
Myokinase	Böhringer, Mannheim
NADH	Böhringer, Mannheim
NADP	Böhringer, Mannheim
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat x 10 H_2O	Merck, Darmstadt
Natronlauge (1 N Titrisol)	Merck, Darmstadt
Nikotinsäure (für biochem. Zwecke)	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure (0,33 mol/l)	Merck, Darmstadt
Phosphoenolpyruvat	Böhringer, Mannheim
Pyruvatkinase	Böhringer, Mannheim
Ribose (D -)	Merck, Darmstadt
Semicarbazidhydrochlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Serum-Albumin	Sigma-Chemical
Triäthanolaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt

2.2. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten junge, männliche Meerschweinchen, die alle vom selben Züchter (Firma HORNER, Niederklein) bezogen wurden. Es wurden nur Tiere mit einem Lebendgewicht zwischen 170 - 250 g verwendet, da hier die Grenzschichtdicke der Herzvorhofwände noch kein Diffusionshindernis darstellt. Neben Trockenfutter der Firma ALTROMIN (Lage/Lippe) erhielten die Tiere Grünfutter und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden vor dem Versuch in Gruppen zu je 8 Tieren in großen Plastikwannen gehalten. Zum Versuch wurden die Tiere nach Zufallskriterien ausgewählt.

2.3. Präparation der isolierten Herzvorhöfe

Die Tiere wurden mit einem Bolzenschußgerät getötet und auf einem Präparierbrett aufgespannt. Zum Ausbluten wurde die Arteria brachialis durchtrennt. Das Herz wurde, wie SEIFART (1978) ausführlich beschreibt, freipräpariert, die Herzspitze abgeschnitten und das Herz dem Thorax entnommen. In einer sauerstoffgesättigten, 30° C-warmen Krebs-Henseleit-Lösung mit 15 mmol/l Glukose wurde das Herz blutleer gespült. Die weitere Präparation erfolgte in einer speziell entwickelten Präparierkammer (MENSING et al., 1976), die die gleiche Temperatur wie die anschliessend benutzte Versuchskammer hatte, d. h. ebenfalls 30° C. Es wurde alle Ventrikelmuskulatur, Gefäß- und Bindegewebe unter Schonung des Sinusknotens abpräpariert, anschließend wurden die Vorhöfe getrennt und mittels einer Serre-fine aus Silber-Kupfer-Legierung (DEGUSSA Nr. 900-000-0,1 mm Ø) angefaßt und in die Muskelhalterung der Versuchskammer eingespannt.

2.4. Methodik des Versuchs

2.4.1. Versuchsanordnung

Die Versuchskammer bestand aus einem Doppelkammer-System (MENSING, 1977), bei dem eine separate Oxygenierkammer mit der eigentlichen Versuchskammer über zwei Röhren verbunden ist. Durch eine im Boden der Oxygenierkammer eingeschmolzene Fritte wird Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) in die Badlösung geperlt, wodurch eine starke Zirkulation zwischen Oxygenier- und Muskelkammer zustande kommt. Das Präparat wird auf diese Weise mit Sauerstoff versorgt, ohne daß Gasblasen an ihm haften bleiben. Durch die relativ hohe Strömungsgeschwindigkeit wird für eine geringe hydrodynamische Grenzschichtdicke (unstirred layer) (WINNE, 1973) an der Oberfläche des Präparates gesorgt. Beide Systeme sind in einem Glasmantel eingeschmolzen und werden über einen Thermostaten mit konstant 30° C-warmem Wasser umspült.

Es wurden je 3 Vorhöfe zusammen in einer der Versuchskammern inkubiert, also pro Inkubationsversuch 6 linke Vorhöfe verwendet. Das Fassungsvermögen jeder Versuchskammer betrug ca. 9 ml. Die genaue Menge an Lösung wurde nach Versuchsende durch Ablassen der Lösung bestimmt. Die Glasgefäße wurden vor jedem Versuch mit Chromschwefelsäure gereinigt, mit sterilem Aqua bidest. gut gespült und anschließend im Trockenschrank getrocknet. Die anderen zum Versuchsaufbau verwendeten Teile wurden in Formalin sterilisiert, gut mit Aqua bidest. abgespült und im Luftstrom getrocknet.

2.4.2. Verwendete Inkubationslösungen

Zur Herstellung der Lösungen wurden folgende serumisotone Stammlösungen gekühlt vorrätig gehalten und bei + 6° C aufbewahrt:

1. 9.00 g NaCl p.a. in 1000 ml ≙ 0.154 mol/l
2. 1.15 g KCl in 100 ml ≙ 0.154 mol/l
3. 1.617g CaCl x $2H_2O$ in 100 ml ≙ 0.110 mol/l
4. 2.11 g KH_2PO_4 p.a. in 100 ml ≙ 0.155 mol/l
5. 3.82 g $MgSO_4$ x $7H_2O$ in 100 ml ≙ 0.155 mol/l
6. 13.00 g $NaHCO_3$ p.a. in 1000 ml ≙ 0.154 mol/l

(Die Hydrogencarbonat-Lösung wurde nach Herstellung zur Stabilisierung 1 h mit CO_2 durchperlt)

Für die Versuche wurde folgendes Nährmedium nach H. A. KREBS und K. H. HENSELEIT (1932) benutzt:

Substanz	mg%	mmol/l	Säugetierserum mg%
Na^+	327	143.3	320
K^+	23	5.9	22
Ca^{++}	10	2.5	10
Mg^{++}	2.9	1.2	2.5
Cl^-	454	128	370
PO_4^{--}	11	1.2	10
SO_4^{--}	11.4	1.2	11
HCO_3^-	54 Vol. %	24	54

Die Badlösung wird mit folgenden Anteilen der Stammlösungen erstellt:

Lösung 1 : 100 Teile
Lösung 2 : 4 Teile
Lösung 3 : 3 Teile
Lösung 4 : 1 Teil
Lösung 5 : 1 Teil
Lösung 6 : 21 Teile

Nach dem Mischen der Lösungen wurde für eine Stunde Carbogen durch das Medium geleitet, bis sich ein konstanter pH von 7.4 eingestellt hatte. Zusätzlich wurde 15 mmol/l Glukose eingewogen.

Diese Grundlösung wurde durch Zugabe von Precursoren und K^+, die ebenfalls in Form von Stammlösungen vorrätig gehalten wurden, variiert.

Verwendete Precursoren:

1. Nikotinsäure-Stammlösung
   12.311 mg/10 ml Aqua bidest. ≙ 10 mmol/l Lösung
   0.5 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 50 µmol/l Inkubationslösung
2. Creatin-Stammlösung
   0.7457 g/10 ml Aqua bidest. ≙ 500 mmol/l Lösung
   1.0 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 5 mmol/l Inkubationslösung
3. Ribose-Stammlösung
   2.252 g/10 ml Aqua bidest. ≙ 1.5 mol/l Lösung
   1.0 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 15 mmol/l Inkubationslösung
4. Adenin-Stammlösung
   27.02 mg/20 ml Aqua bidest. ≙ 10 mmol/l Lösung
   1.0 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 100 µmol/l Inkubationslösung
5. Kaliumchlorid-Stammlösung
   11.184 g/50 ml Aqua bidest. ≙ 3 mol/l Lösung
   a) 0.333 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 15.9 mmol/l Inkubationslösung
   b) 0.5 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 20.9 mmol/l Inkubationslösung
   c) 1.0 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 35.9 mmol/l Inkubationslösung

d) 2.0 ml Stammlösung in 100 ml Krebs-Henseleit Lösung mit Glukose entspricht einer 65.9 mmol/l Inkubationslösung

Für den Versuch wurden folgende unterschiedliche Inkubationslösungen verwendet:

1. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose
2. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose + 10 mmol/l K^+
3. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose + 20 mmol/l K^+
4. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose + 30 mmol/l K^+
5. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose + 60 mmol/l K^+
6. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose
   + Precursoren: Adenin 100 µmol/l
   Ribose 15 mmol/l
   Kreatin 5 mmol/l
   Nikotinsäure 50 µmol/l
7. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose + 10 mmol/l K^+ + Precursoren
8. Krebs-Henseleit + 15 mmol/l Glukose + 60 mmol/l K^+ + Precursoren

2.4.3. Versuchsdauer

Die Herzvorhöfe wurden mit verschiedenen Inkubationslösungen unter Normoxie (95 % O_2 + 5 % CO_2) 0.5 h, 3 h und 5 h inkubiert, unter Anoxiebedingungen zuerst mit Carbogen 3 h vorinkubiert und anschließend mit Stickstoff (95 % N_2 + 5 % CO_2) für 2 h begast.

Einen Überblick über die durchgeführten Versuchskombinationen zeigt folgendes Schema:

Lösung	0.5 h O_2	3 h O_2	5 h O_2	3hO_2+2h N_2
1	A	B	C	D
2		E	F	G
3		H		
4		I		
5		K	L	M
6		N	O	P
7		Q	R	S
8			U	V

Die Reihenfolge der Versuche wurde sowohl hinsichtlich der Versuchsdauer als auch der verwendeten Inkubationslösung nach Zufallskriterien ausgewählt.

2.5. Aufarbeitung der Herzvorhöfe

Nach Beendigung der Versuche wurden die Herzvorhöfe so schnell wie möglich der Muskelhalterung entnommen und zwischen den Backen einer in flüssigem Stickstoff auf -196° C vorgekühlten Wollenbergerzange zu einer dünnen Schicht gepreßt, um jede Stoffwechselaktivität zu stoppen. Sie wurden bis zur Aufarbeitung in einem durchlöcherten Kunststoffgefäß in flüssiger Luft in einem Kühlraum aufbewahrt (WOLLENBERGER et al., 1960). Durch dieses Verfahren wurden außerdem Zellstrukturen zerstört und die nachfolgende Homogenisierung wesentlich erleichtert. Um das Gewebe zu pulverisieren, wurden die Vorhöfe dem flüssigen Stickstoff entnommen und mit einem auf -196° C vorgekühlten Tablettiergerät zu einer Tablette geschlagen. Anschließend wurde die Tablette in 0.8 ml 0.33 N $HClO_4$ im Eisbad homogenisiert (Ultraturrax Fa. Heidolph, Typ RGL 500). Danach wird das Homogenat 20 Minuten in der Kälte stehen lassen und dann mit 3000 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert; der Überstand wird mit einer Pasteurpipette in ein anderes Homogenisationsglas überführt,

10 µl Methylorangeindikator hinzugefügt und unter Rühren (Magnetrührer) mit ca. 130 µl 1 mol/l K_2CO_3-Lösung neutralisiert. Nach 30 Minuten in der Kälte wird dann das ausgefallene K_2ClO_4 bei 3000 U/min 20 Minuten lang abzentrifugiert. Der jetzt gewonnene Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette in ein Eppendorfgefäß überführt und für die biochemischen Analysen verwendet, der Niederschlag aus der ersten Zentrifugation wurde zur Proteinbestimmung nach LOWRY weiterverwendet. Erfolgten die Bestimmungen nicht am gleichen Tag, wurde der neutralisierte Überstand eingefroren. Pro Versuchseinheit standen für die Bestimmungen ca. 940 µl neutralisierter Extrakt zur Verfügung.
Bei den photometrischen Enzymbestimmungen wurde das Probenvolumen der Einzelbestimmungen so dimensioniert, daß die maximalen Extinktionsänderungen ca. 0.3 bei 340 nm betrugen. Verwendet wurden für die

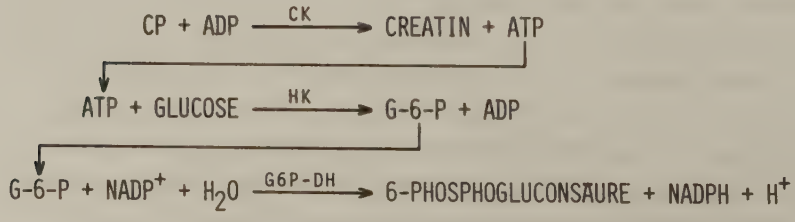
ATP/CP	-Bestimmung	150 µl
ADP/AMP	-Bestimmung	250 µl
NAD	-Bestimmung	400 - 500 µl

2.6. Biochemische Analysen und Berechnungen

2.6.1. ATP/CP-Bestimmung

2.6.1.1. Prinzip der Reaktion

Die Bestimmung erfolgte nach LAMPRECHT et al. (1970) sowie LAMPRECHT und TRAUTSCHOLD (1970).



Die Phosphatübertragung von CP auf ADP wird durch das Enzym Creatinkinase katalysiert. ATP wird durch Hexokinase unter Verbrauch von Glukose zu Glukose-6-Phosphat unter Rückbildung von ADP umgesetzt. Als Indikatorreaktion dient die NADP-abhängige Oxidation des Glukose-6-Phosphats durch G-6-P-Dehydrogenase. Pro Mol CP wird ein Mol NADPH gebildet und durch Extinktionszunahme bei 340 nm in einer 1 cm Halbmikroküvette an einem Spektralphotometer der Firma Beckmann, Typ ACTA M VI gemessen. Die Bestimmung erfolgte bei 25° C, die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm. Die Extinktionsänderung $\triangle E_{340\ nm}$ = 1000 entsprach 0.161 µmol/ml NADPH + H^+.

2.6.1.2. Substanzen und Lösungen

1. Triäthanolaminhydrochlorid, TRA-Puffer (250 mmol/l; pH 7.5 - 7.6)
   11.60 g Triäthanolaminhydrochlorid in 100 ml Aqua bidest. lösen, mit 1 N NaOH unter pH-Kontrolle auf pH 7.5 - 7.6 einstellen und mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen
2. Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADP)
   8.03 mg NADP in 1 ml Aqua bidest. gelöst ≙ 10 mmol/l Lösung
3. Magnesiumchlorid
   1.017 g $MgCl_2$ x 6 H_2O mit Aqua bidest. auf 50 ml auffüllen, entspricht einer 100 mmol/l Lösung
4. Adenosin-5'-diphosphat (ADP)
   7.6 mg ADP in 1 ml Aqua bidest. gelöst ≙ 15 mmol/l Lösung
5. Glukose
   3.603 g Glukose ad 50 ml mit Aqua bidest. auffüllen ≙ 0.4 mol/l Lösung
6. Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-P DH)
   Stammsuspension (1 mg Protein/ml; 140 U/mg) mit 3.2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung ($(NH_4)_2SO_4$) 1 : 5 verdünnen

7. Hexokinase (HK)
   Stammsuspension (2 mg Protein/ml; 140 U/mg) mit 3.2 mol/l Ammoniumsulfat-Lösung 1 : 5 verdünnen
8. Creatinkinase (CK)
   7.2 mg Creatinkinase (18 U/mg) in 1 ml TRA-Puffer lösen

Die NADP- und ADP-Lösungen wurden wöchentlich neu angesetzt, die CK-Lösung alle zwei Tage durch frische Lösung ersetzt. Zum Ansetzen der Lösungen wurde nur frisch destilliertes Aqua bidest. verwendet.

2.6.1.3. Versuchsansatz

Zu je drei gleichzeitig photometrisch gemessenen Proben wurde eine Leerprobe mitbestimmt, um die Eigenextinktion der zugegebenen Enzyme (E_{HK} und E_{CK}) zu ermitteln. Dieser Extinktionswert wurde von den Extinktionsänderungen der Proben abgezogen. Die Leerprobe enthielt alle Bestandteile der Versuchsproben, lediglich das Probenvolumen wurde durch einen Leerwert ersetzt. Diesen Leerwert erhielt man durch Abzentrifugieren einer mit Methylorange-indikator (10 µl) und Kaliumcarbonat (130 µl; K_2CO_3) versetzten 0.33 N Perchlorat-Lösung ($HClO_4$, 800 µl).

Ansatz zur Bestimmung:

1. TRA-Puffer	500 µl	
2. Probe	150 µl	} zusammen 300 µl
3. Aqua bidest.	150 µl	}
4. NADP	50 µl	
5. $MgCl_2$	50 µl	
6. ADP	10 µl	
7. G-6-P DH	10 µl	

Die Substanzen 1 - 7 werden zusammengemischt und die Extinktion E_1 bei 25° C und 340 nm bestimmt. Danach werden

8. Glukose	50 µl
9. Hexokinase	10 µl

innerhalb von 30 Sekunden zugefügt, gemischt und die Extinktionsänderung ca. 20 - 30 Minuten registriert (E_2, ATP) bis durch den erreichten Gleichgewichtszustand die Extinktionsänderung/Minute konstant bleibt. Danach wird

10. Creatinkinase	20 µl

zugefügt, gemischt und wieder die Extinktionsänderung 20 - 30 Minuten verfolgt (E_3, CP). E_2 und E_3 werden durch Extrapolieren der Extinktion auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe bestimmt.

Als Lösung in der Referenzküvette wurde verwendet:

1.	TRA-Puffer	960 µl
2.	G-6-P DH	10 µl
3.	Hexokinase	10 µl
4.	Creatinkinase	20 µl

Die Zugabe der Enzyme muß gleichzeitig in den Probenküvetten und der Referenzküvette erfolgen.

2.6.1.4. Berechnung des ATP/CP-Gehaltes

Die Berechnung des ATP/CP-Gehaltes erfolgt anhand der Extinktionsänderung, die sich aus der Menge NADP, die bei der Reaktion reduziert wird, ergibt.

$$\triangle E_{ATP} = (E_2 - E_1) - E_{HK}$$

$$\triangle E_{CP} = (E_3 - E_2) - E_{CK}$$

$$\text{nmol NADPH/mg Protein} = \text{nmol ATP (bzw. CP)/mg Protein}$$

$$= \frac{\triangle E\ (mm) \times 1000 \times V1 \times V2}{\varepsilon \times d \times 508 \times V3 \times \text{Protein (mg)}}$$

$$\text{nmol ATP/mg Protein} = \frac{\triangle E\ (mm) \times 1000 \times 0.94 \times 0.98}{6.22 \times 508 \times 0.15 \times \text{mg Protein}}$$

$$= \triangle E \times 1.9436/\text{mg Protein}$$

$$\text{nmol CP/mg Protein} = \frac{\triangle E \times 1000 \times 0.94 \times 1.00}{6.22 \times 508 \times 0.15 \times \text{mg Protein}}$$

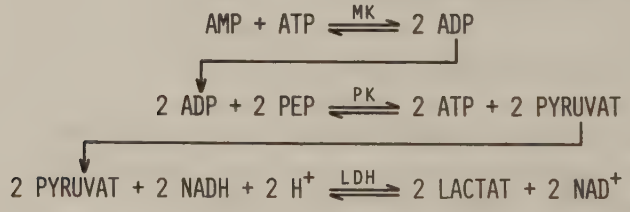
$$= \triangle E \times 1.9832/\text{mg Protein}$$

$\triangle E$ = Extinktionsänderung (mm)
V_1 = Gesamtextraktvolumen (ml)
V_2 = Küvettenvolumen (ml)
V_3 = Ansatzvolumen (ml)
ε = Extinktionskoeffizient bei 340 nm = 6.22
508 = Papierbreite der Registrierung in mm
(Spreizung 0 - 0.5: 10 inch = 508 mm;
Spreizung 0 - 1.0: 10 inch = 254 mm)
d = Schichtdicke (1 cm)

2.6.2. ADP/AMP-Bestimmung

2.6.2.1. Prinzip der Reaktion

Die Bestimmung erfolgte nach JAWOREK und GRUBER, BERGMEYER (1970).



Die Bestimmung mit Myokinase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase erfaßt ADP und AMP in einem Bestimmungsansatz. Die NADH-Abnahme, gemessen als Extinktionsabnahme bei 340 nm, 25° C, Schichtdicke der Küvette 1 cm, ist der AMP- und ADP-Menge proportional. Das Gleichgewicht der LDH-Reaktion liegt mit $K = 10^4$ mol/l hinreichend weit auf der rechten Seite, um alles Pyruvat zu erfassen. Das Gleichgewicht der PK-Reaktion liegt so weit rechts, daß es bereits für sich die mit ca. 66 % links liegende ADP-Dissmutation (MK-Reaktion) ausgleichen kann und alles AMP erfaßt wird.

2.6.2.2. Substanzen und Lösungen

1. Triäthanolaminhydrochlorid (TRA-Puffer)
   Entspricht dem Puffer der ATP/CP-Bestimmung
2. Phosphoenolpyruvat (PEP, 21 mmol/l Lösung)
   8.92 mg PEP (Monokaliumsalz) in 2 ml $MgSO_4$/KCl lösen
   a) Magnesiumsulfat-Lösung (0.375 mol/l Lösung)
      4.622 g $MgSO_4 \times 7H_2O$ ad 50 ml mit Aqua bidest. auffüllen
   b) Kaliumchlorid-Lösung (1.35 mol/l Lösung)
      5.033 g KCl ad 50 ml mit Aqua bidest. auffüllen
3. Adenosin-5'-triphosphat (ATP, 2 mmol/l Lösung)
   6.052 mg ATP in 5 ml Aqua bidest. lösen
4. Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH)
   10.13 mg NADH in 1 ml 5 % $NaHCO_3$ lösen, entspricht einer 14 mmol/l Lösung
   a) Natriumhydrogencarbonat (5 %ige Lösung)
      2.5 g $NaHCO_3$ ad 50 ml mit Aqua bidest. auffüllen
5. Lactatdehydrogenase (LDH)
   Stammsuspension (1 mg Protein/ml; 550 U/mg) mit 3.2 mol/l $(NH_4)_2SO_4$ Lösung 1 : 5 verdünnen
6. Pyruvatkinase (PK)
   Stammsuspension (1 mg Protein/ml; 200 U/mg) mit 3.2 mol/l $(NH_4)_2SO_4$ Lösung 1 : 10 verdünnen
7. Myokinase (MK)
   Stammsuspension (2.5 mg/ml; 360 U/mg) mit 3.2 mol/l $(NH_4)_2SO_4$ Lösung 1 : 2 verdünnen

Die ATP-Lösung wurde wöchentlich, die PEP- und NADH-Lösungen wurden alle zwei Tage neu angesetzt.

2.6.2.3. Versuchsansatz

Die benutzte Leerprobe entspricht der der ATP/CP-Bestimmung. In die Vergleichsküvette wurde folgende Lösung pipettiert:

1. TRA-Puffer	970 µl
2. LDH	10 µl
3. PK	10 µl
4. MK	10 µl

Die Zugabe der Enzyme muß gleichzeitig in die Vergleichs- und die Probenküvetten erfolgen.

Zusammensetzung der Probenküvette:

1. TRA-Puffer	500 µl	
2. Probe	250 µl	zusammen 360 µl
3. Aqua bidest.	110 µl	
4. ATP	50 µl	
5. PEP	50 µl	
6. NADH	10 µl	
7. LDH	10 µl	

Lösung 1 - 7 mischen und die Extinktion gegen die Vergleichsküvette 5 - 10 Minuten registrieren (E_1).
Darauf

8. PK	10 µl

in die Vergleichs- und Probenküvette geben, mischen und 10 - 15 Minuten lang die Extinktionsänderung registrieren (E_2, ADP). Nach Zugabe von

9. MK	10 µl

die Extinktionsänderung 15 - 30 Minuten lang registrieren (E_3, AMP).

Zu je drei gemessenen Proben wurde eine Leerprobe mitbestimmt, und die gemessenen Extinktionsänderungen durch die Enzymgaben (E_{PK}, E_{MK}) wurden von den Extinktionsänderungen der Proben abgezogen.

2.6.2.4. Berechnung des ADP/AMP-Gehaltes

Die Berechnung erfolgt aufgrund der Extinktionsabnahme bei 340 nm infolge der NADH-Oxidation während der Reaktion.

$\triangle E_{ADP} = (E_2 - E_1) - E_{PK}$

$\triangle E_{AMP} = (E_3 - E_2) - E_{MK}$

Da bei fast allen Messungen eine Drift der Extinktion beobachtet wurde, erfolgte die Bestimmung von $\triangle$ E durch Extrapolieren auf den Zeitpunkt der Enzymzugabe.

$$\text{nmol ADP/mg Protein} = \frac{\triangle E \times 1000 \times V1 \times V2}{\varepsilon \times d \times 508 \times V3 \times \text{mg Protein}}$$

$$= \frac{\triangle E \times 1000 \times 0.94 \times 0.99}{6.22 \times 1.0 \times 508 \times 0.25 \times \text{Prot. (mg)}}$$

$$= \triangle E \times 1.178/\text{mg Protein}$$

$$\text{nmol AMP/mg Protein} = \frac{\triangle E \times 1000 \times 0.94 \times 1.0 \times 0.5}{6.22 \times 1.0 \times 508 \times 0.25 \times \text{mg Prot.}}$$

$$= \triangle E \times 0.59498/\text{mg Protein}$$

Der Faktor 0.5 im Zähler bei der Berechnung des Gehaltes an AMP kommt dadurch zustande, daß zur Bestimmung eines Moleküls AMP zwei Moleküle NADH verbraucht werden.
1 nmol NAD = 1/2 nmol AMP.

2.6.3. NAD-Bestimmung

2.6.3.1. Prinzip der Reaktion

Die Bestimmung erfolgt nach KLINGENBERG (1970).

$$\text{ÄTHANOL} + \text{NAD}^+ \underset{}{\overset{\text{ADH}}{\rightleftharpoons}} \text{ACETALDEHYD} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Das Gleichgewicht der Reaktion ist stark zur linken Seite verschoben. Um eine quantitative Reduktion von NAD zu erreichen, arbeitet man bei hohem pH mit hohen Äthanolkonzentrationen und entzieht dem Gleichgewichtssystem den Acetaldehyd, indem man ihn mit Semicarbazid als Semicarbazon bindet. Das entstehende NADH kann photometrisch durch Zunahme der Extinktion bei 340 nm bestimmt werden (Halbmikroküvette Schichtdicke 1 cm, 25° C).

2.6.3.2. Substanzen und Lösungen

1. Triäthanolaminhydrochlorid (TRA-Puffer)
   9.283 g in wenig Aqua bidest. lösen, mit 4 N NaOH auf pH 8.8 einstellen und mit Aqua bidest. auf 50 ml auffüllen. Dies stellt eine 1 mol/l Lösung dar.

2. Semicarbazidhydrochlorid
   0.56 g mit Aqua bidest. auf 50 ml auffüllen. Dies stellt eine 100 mmol/l Lösung dar. Vor der enzymatischen NAD-Bestimmung ist diese Lösung mit absolutem Alkohol im Verhältnis 1 : 2 zu verdünnen.

3. Alkoholdehydrogenase (ADH)
   Stammsuspension (0.6 mg Protein/ml) mit TRA-Puffer 1 : 50 verdünnen.

2.6.3.3. Versuchsansatz

Die verwendete Leerprobe entspricht derjenigen der ATP/CP-Bestimmung. Durch sie werden die Extinktionsänderungen durch die Zugabe von ADH ermittelt (E_{ADH}), die von den Extinktionen der Probenlösungen abgezogen werden müssen. Als Referenzlösung diente Aqua bidest. (1150 µl), dem gleichzeitig mit der Zugabe zu den Probenlösungen 10 µl ADH zugesetzt wurde.

Zusammensetzung der Probenküvette:

1. TRA-Puffer	100 µl	
2. Probe	350 - 400 µl	zusammen 900 µl
3. Aqua bidest.	ad 900 µl	
4. Semicarbazid/Alkohol	150 µl	

Den Versuchsansatz mischen, die Extinktion E_1 5 Minuten registrieren bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Darauf

5. ADH	10 µl

zugeben, mischen und die Extinktionsänderung E_2 10 - 20 Minuten registrieren. $\triangle E = E_2 - E_1$.

2.6.3.4. Berechnung des NAD-Gehaltes

$$\text{nmol NAD/mg Protein} = \frac{\Delta E \times 1000 \times V1 \times V2}{\varepsilon \times d \times 508 \times V3 \times \text{mg Protein}}$$

$$= \frac{\Delta E \times 1000 \times 0.94 \times 1.16}{6.22 \times 1.0 \times 508 \times V3 \times \text{mg Protein}}$$

$$= \Delta E \times 0.345/V3 \times \text{mg Protein}$$

2.6.4. Proteinbestimmung nach LOWRY

2.6.4.1. Prinzip der Reaktion

Die Bestimmung wurde in Anlehnung an die Arbeit von LOWRY et al. (1951) durchgeführt.

Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Bildung eines farbigen Kupferkomplexes, welcher sich durch Anlagerung des Kupferkations an das Proteinmolekül bildet. Hierbei handelt es sich um eine Biuretreaktion im alkalischen Milieu. Ein zweiter Bestandteil des Proteinnachweises besteht in der Reduktion der Phosphormolybdän-/Phosphorwolframsäure durch anwesende aromatische Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan. Die durch die Komplexbildung verursachte Farbänderung läßt sich photometrisch als Extinktionsänderung bei 750 nm quantifizieren. Sie ist jedoch der Proteinkonzentration nicht genau proportional.

2.6.4.2. Substanzen und Lösungen

1. Lösung A (vor jeder Bestimmung frisch anzusetzen)
   a) 1.35 g Kalium-Natriumtartrat x $4H_2O$/50 ml Aqua bid.
   b) 0.5 g Kupfersulfat x $5H_2O$/50 ml Aqua bidest.
   c) 27.04 g Natriumcarbonat x $10H_2O$/500 ml Aqua bidest.

   Mischungsverhältnis:
   a) 0.5 ml
   b) 0.5 ml
   c) 49.0 ml

2. Folin-Ciocalteusreagenz
   Folin-Ciocalteusreagenz vor Gebrauch mit Aqua bidest. im Verhältnis 1 : 1 mischen. Die Lösung soll 1 N und sauer sein.

3. Natronlauge (1 N)
   Gleiche Mengen Folin-Reagenz und NaOH-Lösung müssen eine neutrale Lösung ergeben.

2.6.4.3. Ansatz zur Bestimmung

Das mit $HClO_4$ gefällte Protein wurde in 2 ml 1 N NaOH-Lösung unter ständigem Rühren (Magnetrührer) gelöst; eine klare Lösung lag jedoch erst nach mehrstündigem Rühren vor. Hiervon wurden je 0.5 ml Proteinlösung mit 4.5 ml 1 N Natronlauge verdünnt und diese jetzt 1 : 10 verdünnte Lösung zur weiteren Proteinbestimmung verwendet. Es wurden zu jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt. Die photometrische Bestimmung erfolgte an einem Spektralphotometer der Fa. Zeiss bei 750 nm gegen einen Referenzwert. Diese Referenzlösung enthielt alle Bestandteile des Meßansatzes, lediglich die Proteinlösung wurde durch 1 N Natronlauge ersetzt. Zu jeder Proteinbestimmungsreihe wurden Eichwerte aus frisch angesetzten Serumalbumin-Standards mitgeführt. Nur wenn die Meßwerte der Eichreihe im Streuungsbereich der zuvor erstellten Eichkurve lagen, wurden die gemessenen Proteinkonzentrationen der Proben für die Berechnungen weiterverwendet; war dies nicht der Fall, wurden die Proteinbestimmungen mit nochmals neu angesetzten Lösungen wiederholt.

Ansatz zur Bestimmung:

1. Probe (1 : 10 in 1 N NaOH verdünnt)	0.5 ml
2. Aqua bidest.	0.5 ml
3. Lösung A (frisch angesetzt)	5.0 ml

1. - 3. gut mischen und genau nach 10 Minuten

4. Folinreagenz 0.5 ml

zugeben, gut mischen und nach weiteren 30 Minuten die photometrische Bestimmung durchführen.

2.6.4.4. Eichkurve und Berechnung des Proteingehaltes

Die Eichkurve wurde aus den Mittelwerten der Extinktionen aufsteigender Mengen an Serumalbuminstandards bei 750 nm erstellt. Zur Herstellung dieser Eichlösungen wurden zwei Stammlösungen unterschiedlicher Proteinkonzentration angesetzt. 5 mg Rinderserumalbumin wurden in 10 ml Aqua bidest. gelöst (500 µg/ml; ≙ Standard 2), diese Lösung dann 1 : 2 verdünnt ergab Standard 1 (250 µg/ml). Von diesen Standards wurden folgende Mengen zum Bestimmungsansatz der Proteinbestimmung (siehe 2.6.4.3.) hinzugefügt und ad 500 µl mit Aqua bidest. ergänzt:

50 µl Standard 1 ≙ 12.5 µg Protein
100 µl Standard 1 ≙ 25 µg Protein
200 µl Standard 1 ≙ 50 µg Protein
400 µl Standard 1 ≙ 100 µg Protein

300 µl Standard 2 ≙ 150 µg Protein
400 µl Standard 2 ≙ 200 µg Protein

Die bei diesen Konzentrationen gemessenen Extinktionen sind in folgender Tabelle dargestellt (Tabelle 3). Der mittlere Fehler des Mittelwertes war so klein, daß er in der graphischen Darstellung (Abb. 1) nicht eingezeichnet werden konnte.

Albumin µg	12.5	25	50	100	150	200
E	0.039	0.073	0.147	0.265	0.373	0.488
SEM	0.00072	0.0013	0.0017	0.0026	0.0031	0.0029
n	24	26	25	27	25	25

Tab.3:

Proteinkonzentrationen, Extinktionen (Mittelwerte), mittlere Abweichungen der Mittelwerte und Versuchsanzahl der Proteinbestimmungen.

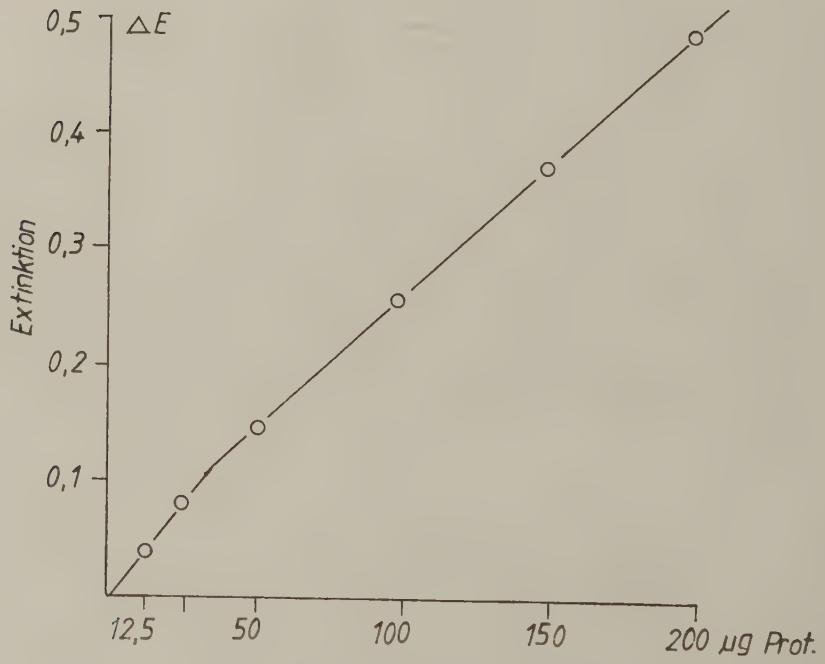


Abb.1 *Proteineichkurve*

Die Berechnung der Proteinmenge der Proben erfolgte anhand der aus den Proteineichwerten berechneten Regressionsgeraden. Berücksichtigt wurden nur die Extinktionswerte für Proteingehalte über 50 µg, da alle gemessenen Proben grössere Proteingehalte aufwiesen und die Proteineichkurve im Bereich 0 - 50 µg etwas steiler verläuft als im Bereich 50 - 200 µg Protein.

Der Korrelationskoeffizient der Geraden hat einen Wert von 0.995, d. h. daß die Einzelwerte, die zur Berechnung der Geraden verwendet wurden, eine sehr geringe Streuung aufweisen.

Berechnung des Proteingehaltes (mg) aus der Eichkurve:

$$y = bx + a$$

$$b = \frac{y - a}{x} = \frac{E2 - E1}{\text{mg Protein}}$$

$$y = 0.0023\ x + 0.035$$

$$\text{mg Protein} = x = \frac{E - 0.035}{0.0023} \times 40 \text{ (Verdünnung)}$$

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte an einem programmierbaren Rechner der Firma Hewlett/Packard (HP 97) mit einem in Basic geschriebenen Rechnerprogramm nach DIEPOLD (1979). Ein signifikanter Unterschied wurde mit dem Gruppen t-Test nach Student bestimmt, wobei $p < 0.05$ als signifikant angesehen wurde (WINNE, 1964, 1965). Für den Mittelwert wurde $\bar{x}$, für die Streubereiche der mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Die Eliminierung von Extremwerten erfolgte nach der Formel:

$$y = \frac{X_N - X_{N-1}}{X_N - X_1}$$

X_N = Extremwert

X_{N-1} = nächstliegender Wert zu X_N

X_1 = niedrigster Wert

Der y-Wert wurde in den GEIGY-Tabellen für die jeweilige Versuchstierzahl nachgeschlagen und mit $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen unter Normoxie, 30° C

3.1.1. Inkubationsdauer 3 h, ohne Precursoren

ATP, ADP, AMP, Gesamtadeninnukleotidpool (AN-Pool), CP- und NAD-Gehalt wurden zu Beginn und nach 3-stündiger Inkubation unter Kontrollbedingungen sowie mit Lösungen ansteigender K^+-Konzentrationen bestimmt (Abb. 2).

Kontrollversuche:

C_0 : 0 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 5)
C_1 : 3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)
C_1' : 3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 8)

K^+-Depolarisation:

K_1^+ : +10 mmol/l KCl (≙ -57 mV) (n = 6)
K_2^+ : +20 mmol/l KCl (≙ -45 mV) (n = 6)
K_3^+ : +30 mmol/l KCl (≙ -36 mV) (n = 6)
K_4^+ : +60 mmol/l KCl (≙ -20 mV) (n = 5)
3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose

Die Versuche C_1' und K_4^+ wurden nachträglich wiederholt. Die Versuchsbedingungen vom zuerst durchgeführten Versuch K_4^+ waren nicht optimal, weil die Begasung mit O_2 teilweise ausfiel und deshalb mit anoxischen Zuständen in den Inkubationskammern gerechnet werden mußte. Der Versuch C_1' dient als Kontrolle für K_4^+, gegenüber der Kontrolle C_1 liegen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor. Weder im ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP- noch im NAD-Gehalt konnten ansteigende K^+-Konzentrationen Veränderungen gegenüber den Kontrollgruppen bei 0 und 3 h hervorrufen. Die Mittelwerte sowie die mittleren Abweichungen der Mittelwerte der einzelnen Parameter sind aus Tab. 4 zu entnehmen. Der einzige signifikante Unterschied dieses Versuchsteils ergab sich im NAD-Gehalt der beiden Kontrollen C_1 und C_1' ($p < 0.05$).

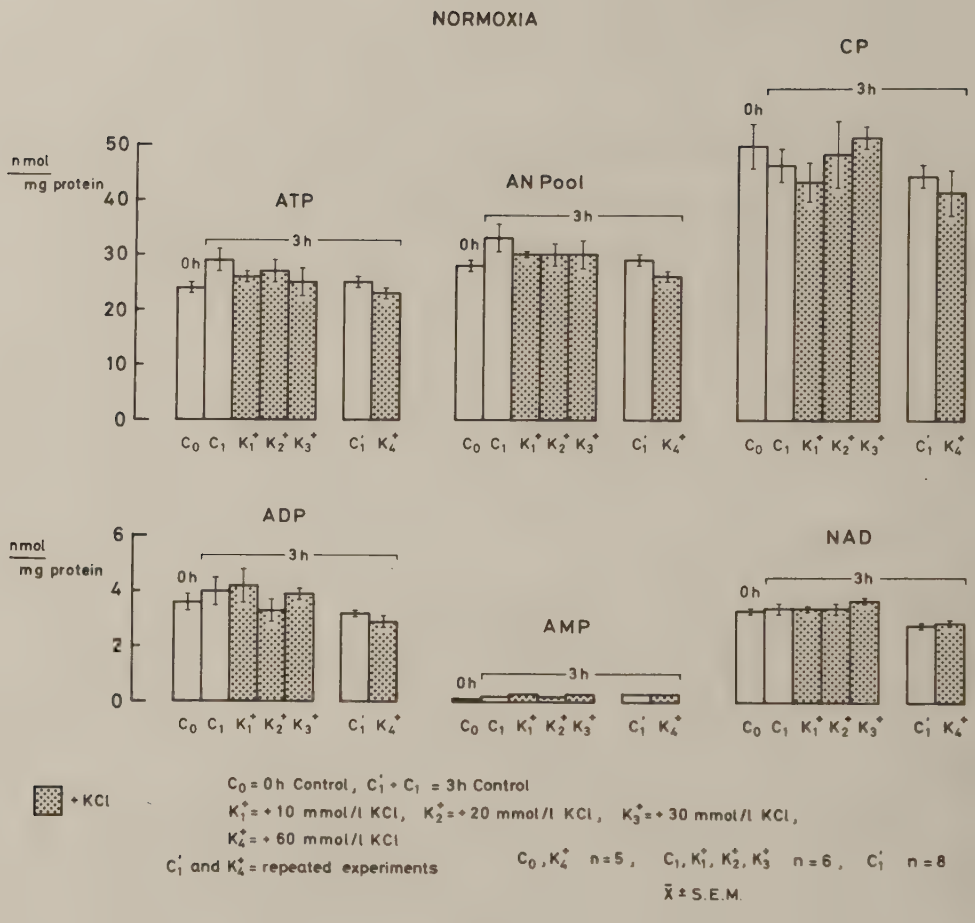


Abb.2:

ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Normoxie, 3 h Inkubation ohne Precursoren

	POOL	ATP	CP	ADP	AMP	NAD	mg Prot.	n
	nmol/mg Protein ± SEM							
C_o	28.09 ± 0.57	24.36 ± 0.61	49.45 ± 4.24	3.60 ± 0.25	0.13 ± 0.08	3.30 ± 0.08	3.27 ± 0.30	5
C_1	33.28 ± 2.45	29.02 ± 2.07	45.79 ± 2.76	4.01 ± 0.48	0.24 ± 0.13	3.41 ± 0.21	3.26 ± 0.16	6
K_1^+	30.06 ± 0.52	25.57 ± 0.73	43.33 ± 3.54	4.21 ± 0.55	0.26 ± 0.10	3.42 ± 0.13	3.44 ± 0.20	6
K_2^+	30.22 ± 2.39	26.72 ± 2.14	47.94 ± 5.93	3.28 ± 0.40	0.21 ± 0.06	3.38 ± 0.22	3.08 ± 0.30	6
K_3^+	29.62 ± 2.51	25.42 ± 2.51	51.09 ± 1.62	3.90 ± 0.19	0.29 ± 0.09	3.67 ± 0.12	2.83 ± 0.11	6
C_1'	28.8 ± 0.93	25.34 ± 0.89	43.81 ± 2.04	3.15 ± 0.10	0.30 ± 0.11	2.82 ± 0.07	3.09 ± 0.25	8
K_4^+	26.27 ± 0.66	23.05 ± 0.74	41.16 ± 3.74	2.92 ± 0.18	0.29 ± 0.11	2.94 ± 0.11	2.87 ± 0.06	5

Tab.4:

Mittelwerte ($\bar{x}$) und mittlere Abweichungen der Mittelwerte (± SEM) unter Normoxie, Inkubation bei 30° C, 3 h O_2 ohne Precursoren

Dies zeigt, daß gleiche Versuche, die in größeren Zeitabständen durchgeführt werden, unterschiedliche Ergebnisse liefern können. Dies muß für die Benutzung einer Kontrollgruppe als Bezugsgruppe mit Berücksichtigung finden.

3.1.2. Inkubationsdauer 5 h, ohne Precursoren

ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP und NAD-Gehalt wurden unter Kontrollbedingungen sowie unter zusätzlich niedriger und hoher K^+-Konzentration unter Normoxie, Inkubation bei 30° C für 5 h untersucht (Abb. 3).

Kontrollversuche:

C_0 : 0 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 5)

C_1 : 5 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)

K^+-Depolarisation:

K_1^+ : +10 mmol/l KCl (≙ -57 mV) (n = 6)

K_4^+ : +60 mmol/l KCl (≙ -20 mV) (n = 6)
5 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose

Es zeigten sich bei keinem der untersuchten Parameter Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den Versuchsgruppen mit K^+-Depolarisation. Auch gegen die Kontrollwerte bei 3 h Sauerstoffinkubation sowie die K^+-Depolarisationsgruppen bei 3 h O_2 waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Die Mittelwerte und mittleren Fehler der Mittelwerte der einzelnen Parameter sind in Tab. 5 dargestellt.

3.1.3. Inkubationsdauer 3 h, mit Precursoren

ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP und NAD-Gehalt wurden nach 3 Stunden Inkubation unter Kontrollbedingungen sowie unter Zusatz von Precursoren und niedriger K^+-Konzentration untersucht. Inkubation bei 30° C, Normoxie (Abb. 4).

Kontrollversuche:

C_1 : 3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)

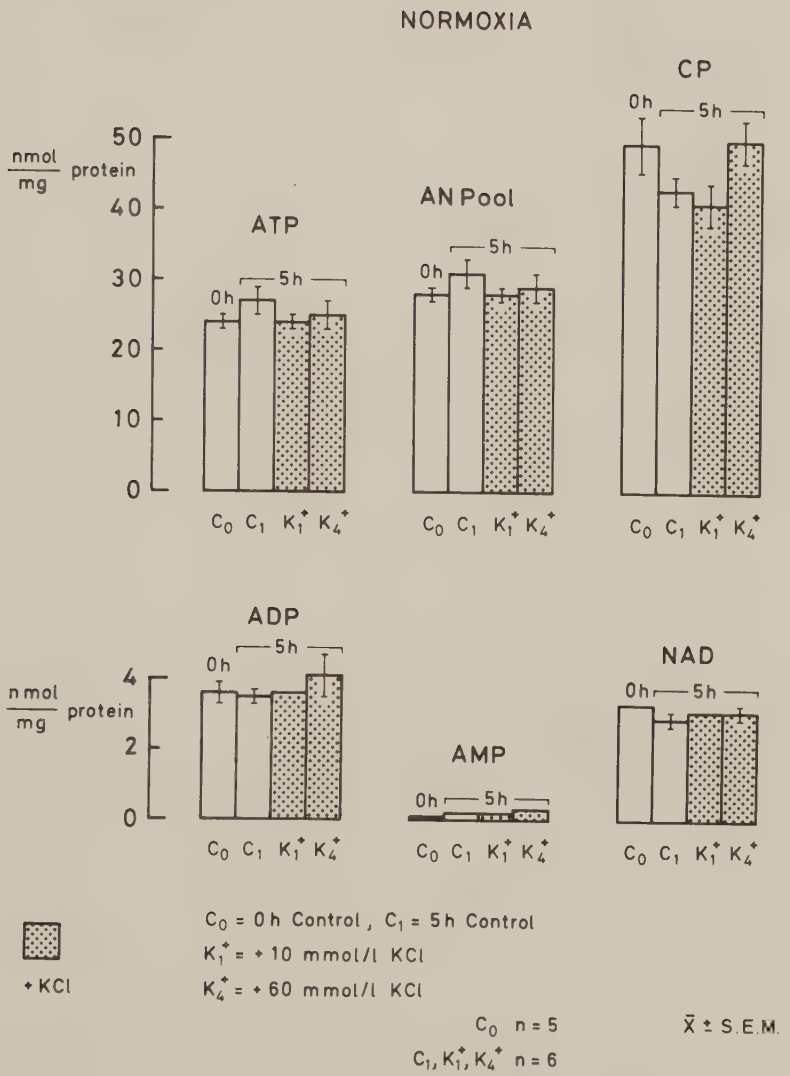


Abb.3 :

ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Normoxie, 5 h Inkubation ohne Precursoren

	POOL	ATP	CP	ADP	AMP	NAD	mg Prot.	n
	nmol / mg Protein ± SEM							
C_o	28.09 ± 0.57	24.36 ± 0.61	49.45 ± 4.24	3.60 ± 0.25	0.13 ± 0.08	3.30 ± 0.08	3.27 ± 0.30	5
C_1	30.83 ± 1.84	27.07 ± 1.72	43.16 ± 2.40	3.54 ± 0.18	0.21 ± 0.10	2.93 ± 0.19	2.68 ± 0.30	6
K_1^+	27.86 ± 1.16	24.03 ± 1.14	41-10 ± 2.83	3.63 ± 0.04	0.19 ± 0.08	3.07 ± 0.11	2.66 ± 0.25	6
K_4^+	29.00 ± 2.15	24.60 ± 1.63	49.86 ± 2.96	4.11 ± 0.55	0.27 ± 0.10	3.12 ± 0.16	2.79 ± 0.25	6

Tab.5 :

Mittelwerte ($\bar{x}$) und mittlere Abweichungen der Mittelwerte (± SEM) unter Normoxie, Inkubation bei 30° C, 5 h O_2 ohne Precursoren

C_2 : 3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose + Precursoren (Adenin 0.1 mmol/l, Ribose 15 mmol/l, Nikotinsäure 0.05 mmol/l, Creatin 5 mmol/l) (n = 6)

K^+-Depolarisation:

K_1^+ : +10 mmol/l KCl (≙ -57 mV) (n = 6)
3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose + Precursoren

Es konnten nach 3 Stunden Inkubation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen mit und ohne Precursorenzugabe festgestellt werden; auch zwischen den Kontrollgruppen und der Versuchsgruppe mit K^+-Depolarisation gab es keine Unterschiede im Gehalt der energiereichen Phosphate und NAD. Zwar lagen die Werte der einzelnen Parameter der Kontrollgruppe mit Precursoren über denen der Kontrollgruppe ohne Precursoren, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Unter Kaliumeinfluß wurde der geringfügige Erhöhungseffekt der Precursoren nicht mehr beobachtet. Die CP-Gehalte lagen unter Precursorenzusatz sowie unter Precursorenzusatz und Kaliumerhöhung geringfügig unter den Werten der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte und mittleren Abweichungen der Mittelwerte sind Tab. 6 zu entnehmen.

3.1.4. Inkubationsdauer 5 h, mit Precursoren

ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP und NAD-Gehalt wurden nach 5 Stunden Inkubation (Normoxie, 30° C) unter Kontrollbedingungen, nach Zusatz von Precursoren sowie nach Zusatz von Precursoren und zusätzlich niedriger und hoher Kaliumkonzentration bestimmt (Abb. 4).

Kontrollversuche:

C_1 : 5 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)

C_2 : 5 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose + Precursoren (n = 6)

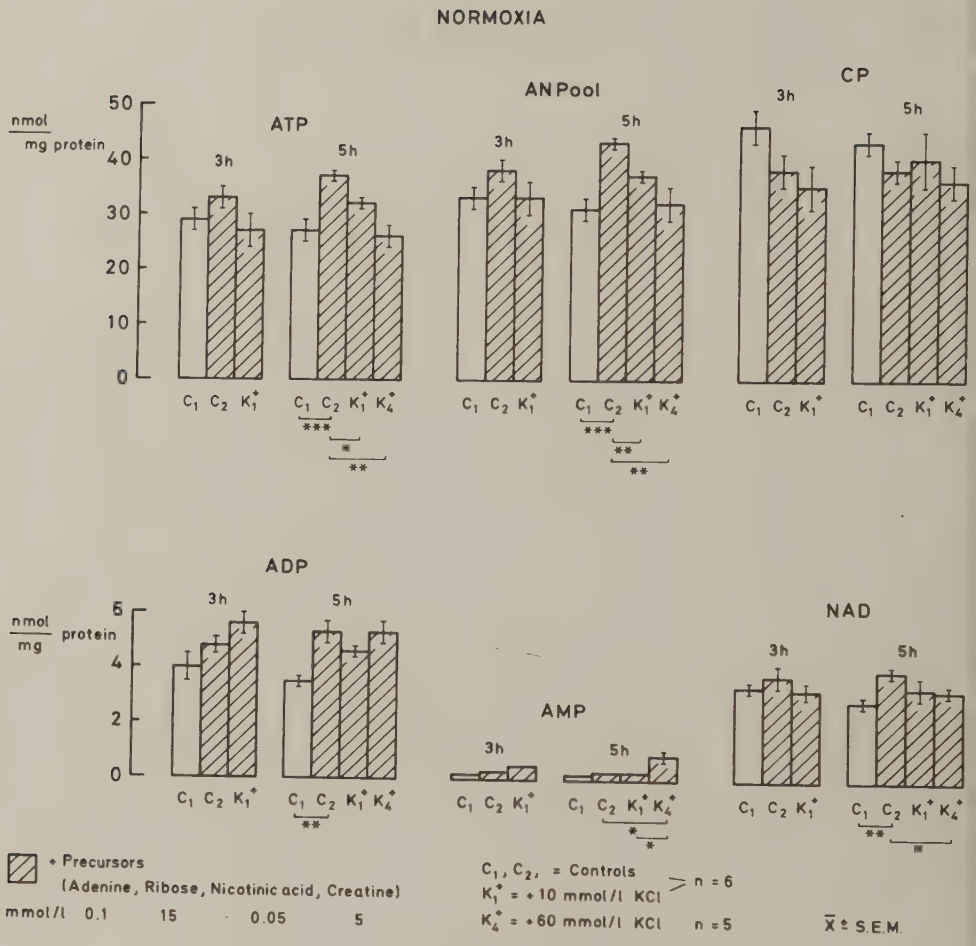


Abb.4:

ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarsation unter Normoxie, 3 h und 5 h Inkubation mit Precursoren

	POOL	ATP	CP	ADP	AMP	NAD	mg Prot.	n	
	nmol/mg Protein ± SEM								
C_1	33.28 ± 2.45	29.02 ± 2.07	45.79 ± 2.76	4.01 ± 0.48	0.24 ± 0.13	3.41 ± 0.21	3.26 ± 0.16	6	3 h O_2
C_2	38.37 ± 1.68	33.25 ± 1.79	37.92 ± 2.74	4.83 ± 0.25	0.28 ± 0.1	3.80 ± 0.36	2.70 ± 0.23	6	
K_1^+	32.73 ± 2.73	26.69 ± 2.54	35.09 ± 3.55	5.56 ± 0.44	0.47 ± 0.11	3.33 ± 0.26	2.81 ± 0.25	6	
C_1	30.83 ± 1.84	27.07 ± 1.72	43.16 ± 2.40	3.54 ± 0.18	0.21 ± 0.10	2.93 ± 0.19	2.68 ± 0.30	6	5 h O_2
C_2	43.07 ± 1.34	37.4 ± 1.29	38.0 ± 1.66	5.33 ± 0.42	0.32 ± 0.11	3.95 ± 0.15	2.84 ± 0.25	6	
K_1^+	36.85 ± 1.37	32.02 ± 1.31	39.65 ± 5.28	4.58 ± 0.21	0.24 ± 0.09	3.40 ± 0.43	3.42 ± 0.45	6	
K_4^+	32.31 ± 2.55	26.16 ± 2.43	35.64 ± 2.57	5.29 ± 0.37	0.85 ± 0.20	3.34 ± 0.21	2.07 ± 0.18	5	

Tab.6:

Mittelwerte ($\bar{x}$) und mittlere Abweichung der Mittelwerte (± SEM) unter Normoxie, Inkubation bei 30° C, 3 h O_2 und 5 h O_2 mit Precursoren

K^+-Depolarisation:

K_1^+ : +10 mmol/l KCl (≙ -57 mV) (n = 6)

K_4^+ : +60 mmol/l KCl (≙ -20 mV) (n = 5)

5 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose + Precursoren

Nach 5 Stunden Inkubation mit Precursoren steigt der ATP-Gehalt signifikant ($p < 0.001$) um 38 % gegenüber dem Kontrollwert an (Abb. 4, Tab. 6). Diese erhöhte ATP-Synthese wird jedoch mit steigender K^+-Depolarisation gehemmt, und die ATP-Gehalte liegen dann wieder im Bereich des Kontrollwertes. Der Abfall gegenüber C_2 war für K_1^+ (5 h O_2) mit $p < 0.05$ und für K_4^+ mit $p < 0.01$ signifikant.

Der AN-Gesamtpool der Versuchsgruppen verhält sich entsprechend dem ATP-Gehalt.

Der CP-Gehalt wird durch Zugabe von Precursoren nicht signifikant verändert, auch steigende K^+-Konzentrationen bleiben ohne Effekt.

ADP zeigt einen signifikanten Anstieg ($p < 0.01$) bei Zugabe von Precursoren gegenüber der Kontrolle ohne Precursoren. Durch Erhöhung der K^+-Konzentration ändert sich der ADP-Gehalt gegenüber der Kontrollgruppe mit Precursorenzusatz (C_2) nicht, er bleibt gegenüber der Versuchsgruppe C_1 erhöht.

AMP war nur nach Precursorenzusatz und hoher Kaliumkonzentration signifikant unterschiedlich zu den übrigen Versuchsgruppen (Kontrollen mit und ohne Precursorenzusatz, Versuchsgruppe mit Precursoren und niedriger K^+-Konzentration).

Der ATP/(ADP + AMP)-Quotient verschiebt sich unter den angegebenen Versuchsbedingungen. Vom höchsten Wert beim Kontrollversuch sinkt der Quotient mit steigender K^+-Konzentration ab. Er erreicht mit 4.3 bei 65.9 mmol/l K^+ seinen niedrigsten Wert (Abb. 5).

QUOTIENT $\frac{ATP}{ADP + AMP}$

		Incubation-time (Hours)	Normoxia (95% O_2 + 5% CO_2)	Anoxia (3h O_2 + 2h N_2) (95% N_2 + 5% CO_2)
without Precursors	Control$_0$	0	6.7 ± 0.6	——
	Control$_1$	5	7.2 ± 0.4	3.1 ± 0.3
	K_1^+	5	6.3 ± 0.3	2.6 ± 0.2
	K_4^+	5	5.9 ± 0.5	0.5 ± 0.05
with Precursors	Control$_2$	5	6.8 ± 0.5	3.6 ± 0.3
	K_1^+	5	6.7 ± 0.4	2.1 ± 0.3
	K_4^+	5	4.3 ± 0.5	0.8 ± 0.2

* P < 0.05
** P < 0.01
*** P < 0.001

N = 6
C_0 N = 5
with Precursors K_4^+ N = 5

K_1^+ = +10 mmol/l KCl
K_4^+ = +60 mmol/l KCl

Precursors:	Adenine,	Ribose,	Nicotinic Acid,	Creatine
mmol/l	0.1	15	0.05	5

Abb.5:

ATP/(ADP + AMP)-Quotient der angegebenen Versuche:
Anoxie (3 h O_2 + 2 h N_2) und Normoxie, 5 h Inkubation mit und ohne Precursoren.
Angegeben sind Mittelwerte ($\bar{x}$) und mittlere Abweichungen der Mittelwerte (± SEM) sowie die Signifikanzgrenzen zwischen den Versuchsgruppen

NAD wurde durch Zugabe von Precursoren gegenüber der Kontrollgruppe ohne Precursoren signifikant ($p < 0.01$) erhöht. Dieser positive Effekt wird jedoch schon durch geringe Kaliumerhöhung gehemmt; signifikante Änderungen zeigen sich jedoch erst bei hohen K^+-Konzentrationen.

Es läßt sich zusammenfassend sagen, daß schon nach 3 h Inkubation unter Normoxie durch Precursoren ein Anstieg des Gehaltes an ATP, ADP, AN-Pool und NAD zu verzeichnen ist, jedoch sind diese Veränderungen erst nach 5 h Inkubation unter Normoxie gegenüber den Kontrollwerten signifikant. Kalium antagonisiert diesen Effekt der Precursoren dosisabhängig.

Mittelwerte und mittlere Abweichungen der Mittelwerte dieses Versuchsteils sind aus Tab. 6 zu entnehmen.

3.2. Untersuchungen unter Anoxie, 30° C

3.2.1. Inkubationsdauer 3 h O_2 + 2 h N_2, ohne Precursoren

ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP und NAD-Gehalt wurden nach 3 Stunden Inkubation unter Normoxie und sich anschliessender 2-stündiger Anoxie unter Kontrollbedingungen sowie unter Kaliumeinfluß untersucht (Abb. 6).

Kontrollversuche:

C_0 : 0 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)
C_1 : 3 h O_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)
C_2 : 3 h O_2 + 2 h N_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)

K^+-Depolarisation:

K_1^+ : + 10 mmol/l KCl (≙ -57 mV) (n = 6)
K_4^+ : + 60 mmol/l KCl (≙ -20 mV) (n = 6)
3 h O_2 + 2 h N_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose

Unter Anoxie ändert sich der ATP-Gehalt gegenüber dem normoxischen Ausgangswert von 0 Stunden Inkubation nicht.

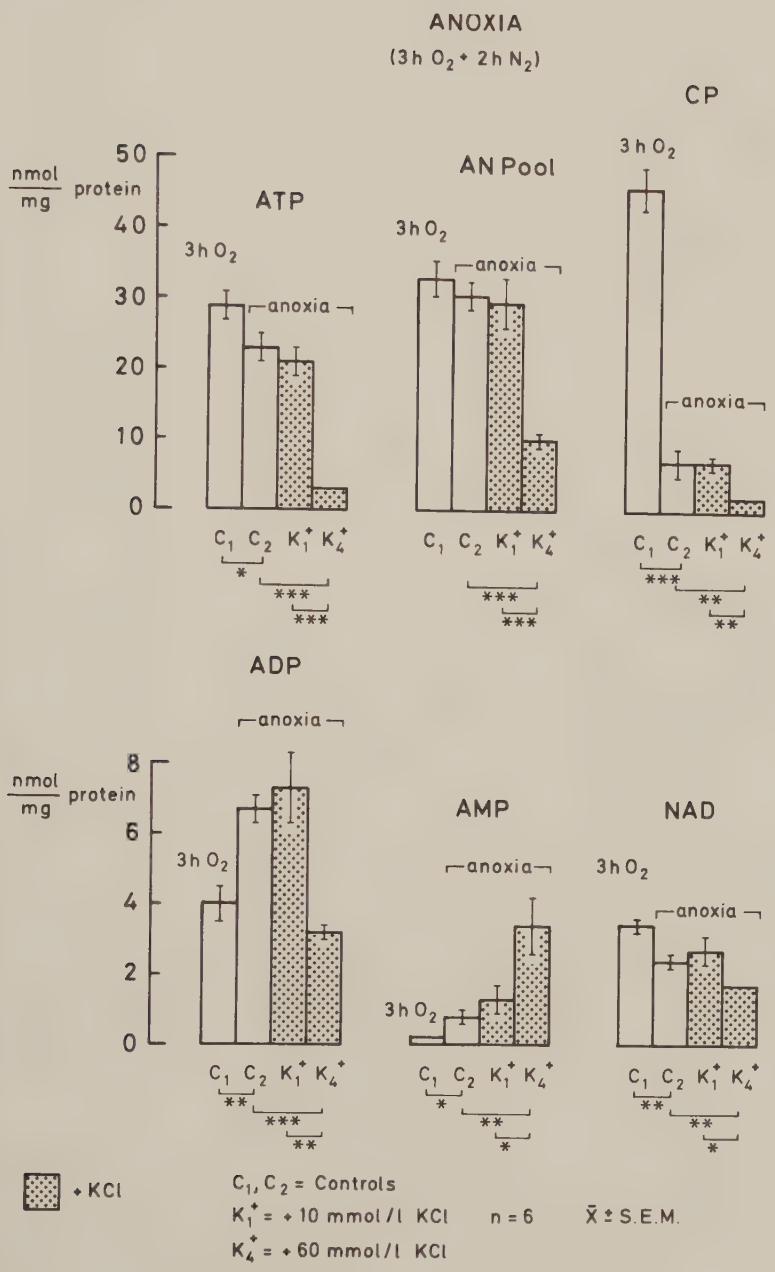


Abb.6:

ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Anoxie, 3 h O_2 + 2 h N_2 Inkubation ohne Precursoren

	POOL	ATP	CP	ADP	AMP	NAD	mg Prot.	n
	nmol / mg Protein ± SEM							
C_1	33.28 ± 2.45	29.02 ± 2.07	45.79 ± 2.76	4.01 ± 0.48	0.24 ± 0.13	3.41 ± 0.21	3.26 ± 0.16	6
C_2	30.49 ± 1.61	23.05 ± 1.54	7.23 ± 1.56	6.67 ± 0.38	0.75 ± 0.17	2.42 ± 0.16	2.99 ± 0.23	6
K_1^+	29.47 ± 3.51	20.91 ± 2.20	6.75 ± 1.18	7.26 ± 0.97	1.29 ± 0.41	2.70 ± 0.36	2.62 ± 0.28	6
K_4^+	9.61 ± 1.06	2.99 ± 0.27	1.88 ± 0.40	3.20 ± 0.17	3.42 ± 0.74	1.69 ± 0.09	3.22 ± 0.22	6

Tab.7:
Mittelwerte ($\bar{x}$) und mittlere Abweichungen der Mittelwerte (± SEM) unter Anoxie, Inkubation bei 30° C, 3 h O_2 und 2 h N_2 ohne Precursoren

Gegenüber dem 3-Stunden-Wert unter Normoxie (C_1), der höher liegt als der 0-Stunden-Wert (kein signifikanter Unterschied) erfolgt unter Anoxie ein signifikanter ATP-Abfall ($p < 0.05$, C_2).

Der AN-Pool verhält sich unter diesen Bedingungen entsprechend, doch sind die Veränderungen nicht signifikant. ADP ($p < 0.01$) und AMP ($p < 0.05$) sind unter Anoxie gegenüber der normoxischen Kontrolle signifikant erhöht, NAD ($p < 0.05$) erniedrigt.

Der ATP/(ADP + AMP)-Quotient verschiebt sich von unter Normoxie etwa bei 7.0 liegenden Werten auf anoxische Werte um 3.0 (Abb. 5); diese Veränderungen im Nukleotidverhältnis sind mit $p < 0.001$ hochsignifikant.

Der Gehalt an CP ist nach der 2-stündigen anoxischen Versuchsphase hochsignifikant ($p < 0.001$) um 85 % gegenüber der normoxischen 3-Stunden-Kontrolle abgefallen. Unter der zusätzlichen Gabe von 10 mmol/l K^+ (Versuchsgruppe K_1^+) entsprechen die gemessenen Gehalte der energiereichen Phosphate und NAD den Werten der anoxischen Kontrolle ohne Kaliumzusatz (C_2).

Erst bei hohen Kaliumkonzentrationen erfolgt ein signifikanter Abfall von ATP, ADP, AN-Pool, CP und NAD-Gehalt gegenüber den Kontrollen unter Anoxie ohne Zusatz von Kalium (C_2) und auch gegenüber der Versuchsgruppe mit niedriger K^+-Konzentration. AMP steigt bei hohen Kaliumkonzentrationen signifikant an.

	K_4^+ gegen K_1^+	K_4^+ gegen C_2
ATP	$p < 0.001$	$p < 0.001$
AN-Pool	$p < 0.001$	$p < 0.001$
ADP	$p < 0.01$	$p < 0.001$
AMP	$p < 0.05$	$p < 0.05$
CP	$p < 0.01$	$p < 0.01$
NAD	$p < 0.05$	$p < 0.01$

Die Mittelwerte und mittleren Abweichungen der Mittelwer-

te des Versuchsteils "Anoxie", Inkubation ohne Precursoren sind Tab. 7 zu entnehmen.

3.2.2. Inkubationsdauer 3 h O_2 + 2 h N_2, mit Precursoren

ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP und NAD-Gehalt wurden unter 2-stündiger Anoxie nach vorausgegangener 3-stündiger Normoxiephase unter Kontrollbedingungen, mit Zusatz von Precursoren sowie mit niedriger und hoher K^+-Konzentration im Inkubationsmedium bestimmt (Abb. 7).

Kontrollversuche:

C_1 : 3 h O_2 + 2 h N_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose (n = 6)

C_2 : 3 h O_2 + 2 h N_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose + Precursoren (n = 6)

K^+-Depolarisation:

K_1^+ : +10 mmol/l KCl (≙ -57 mV) (n = 6)

K_4^+ : +60 mmol/l KCl (≙ -20 mV) (n = 5)
3 h O_2 + 2 h N_2, K.-H.-Lösung + 15 mmol/l Glukose + Precursoren

Durch Zugabe von Precursoren (Adenin: 0.1 mmol/l; Ribose: 15 mmol/l; Nikotinsäure: 0.05 mmol/l; Creatin: 5 mmol/l) wurde unter Anoxie-Bedingungen keine Änderung der untersuchten Parameter gegenüber der Kontrolle ohne Precursorenzusatz (C_1) festgestellt. Zwar sind sowohl ATP, AN-Pool und NAD gegenüber den Kontrollen leicht erhöht, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Unter K^+-Depolarisation ist schon bei niedriger Kaliumkonzentration ein signifikanter Abfall von ATP ($p < 0.05$) und CP ($p < 0.05$) sowie ein Anstieg des AMP ($p < 0.05$) gegenüber C_2 zu beobachten. Der AN-Pool ist nicht signifikant erniedrigt, ADP und NAD sind unverändert. Bei hohen Kaliumkonzentrationen erniedrigen sich die Werte von ATP, AN-Pool und ADP gegenüber den Werten bei niedriger Kaliumkonzentration hochsignifikant ($p < 0.001$), der NAD-Gehalt

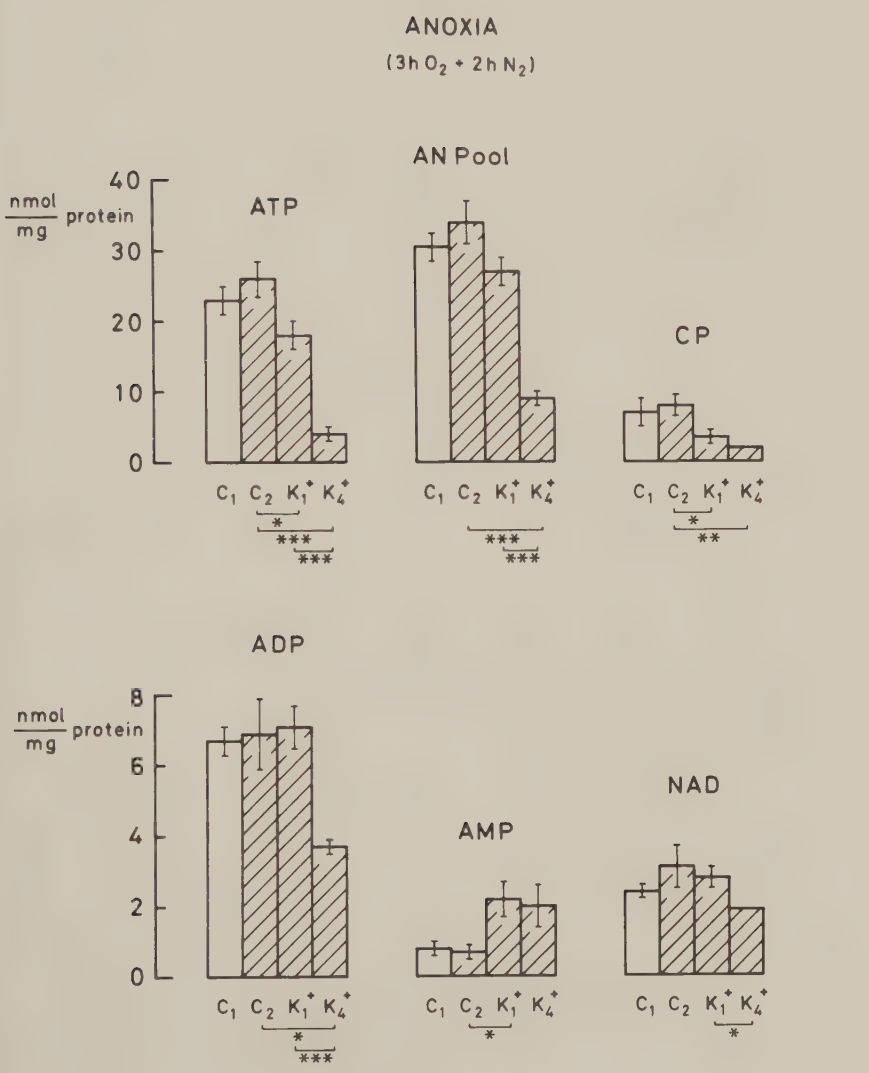


Abb.7:

ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Anoxie, 3 h O_2 + 2 h N_2 Inkubation mit Precursoren

	POOL	ATP	CP	ADP	AMP	NAD	mg Prot.	n
	nmol / mg Protein ± SEM							
C_1	30.49 ± 1.61	23.05 ± 1.54	7.23 ± 1.56	6.67 ± 0.38	0.75 ± 0.17	2.42 ± 0.16	2.99 ± 0.23	6
C_2	33.92 ± 3.31	26.33 ± 2.50	8.13 ± 1.38	6.92 ± 0.97	0.65 ± 0.17	3.12 ± 0.58	2.17 ± 0.23	6
K_1^+	27.08 ± 2.05	17.80 ± 1.65	3.43 ± 0.94	7.11 ± 0.60	2.17 ± 0.48	2.84 ± 0.30	3.28 ± 0.42	6
K_4^+	9.40 ± 0.58	3.72 ± 0.69	2.07 ± 0.45	3.71 ± 0.2	1.96 ± 0.62	1.89 ± 0.14	2.57 ± 0.29	5

Tab.8:
Mittelwerte ($\bar{x}$) und mittlere Abweichungen der Mittelwerte (± SEM) unter Anoxie, Inkubation bei 30° C, 3 h O_2 und 2 h N_2 mit Precursoren

sinkt signifikant ($p < 0.05$). CP- und AMP-Werte bleiben unverändert.

Gegenüber der Kontrollgruppe C_2 verhalten sich die Parameter von K_4^+ prinzipiell wie zu K_1^+. Signifikanzunterschiede ergeben sich in erster Linie durch unterschiedliche Standardabweichungen in den einzelnen Versuchsgruppen.

Der ATP/(ADP + AMP)-Quotient sinkt mit zunehmender K^+-Konzentration gegenüber den Kontrollen (C_2) ab; bei niedriger Kaliumkonzentration unter der Wirkung von zusätzlicher Precursorengabe stärker als in den Versuchsgruppen ohne Precursoren. Der Abfall erfolgt jedoch von etwas höheren Ausgangswerten bei C_2 und wird deshalb signifikant.

Die Signifikanzgrenzen dieses Versuchsteils sind für:

	$K_4^+ - K_1^+$	$K_4^+ - C_2$	$K_1^+ - C_2$
ATP	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.05$
CP	p -	$p < 0.01$	$p < 0.05$
AN-Pool	$p < 0.001$	$p < 0.001$	p -
ADP	$p < 0.001$	$p < 0.05$	p -
AMP	p -	p -	$p < 0.05$
NAD	$p < 0.05$	p -	p -
ATP/(ADP + AMP)	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.01$

Die gemessenen Mittelwerte und mittleren Abweichungen der Mittelwerte sind aus Tab. 8 zu entnehmen.

4. DISKUSSION

4.1. Wirkung von Precursoren auf den Energiestoffwechsel

Die in der Herzchirurgie angewandten Verfahren, durch intermittierende Unterbindung der Aorta bzw. Coronarperfusion mit cardioplegischen Lösungen in Kombination mit Hypothermie ein ruhiggestelltes und blutleeres Herz für die Operation zu erhalten, stellen im Gegensatz zur reinen Anoxie, bei der es "nur" zu einem Mangel an Sauerstoff im Gewebe kommt, auch eine Reduktion der Nährsubstrate dar. Sie können darüberhinaus, je nach angewandter Technik, auch zu einer Retention von Stoffwechselprodukten führen. Die in den 70er Jahren angewandten Cardioplegietechniken führten zu einer signifikanten perioperativen Infarktrate, zur Zerstörung von Muskelzellen und zur Notwendigkeit der Anwendung positiv inotroper Agentien wegen einer hohen Incidenz von postoperativem "low out-put syndrom". Dies führte vor Augen, daß das Überleben von Herzmuskelzellen unter diesen Bedingungen durch spezifische protektive Maßnahmen gewährleistet werden muß. Es kann sonst zu bleibenden, teils auch erst lange nach der Operation auftretenden Herzschäden kommen. Neben einer rasch einsetzenden Asystolie zur Verhinderung des Abbaus energiereicher Substrate durch nichtproduktive elektromechanische Arbeit und der Herabsetzung von Stoffwechselvorgängen durch Hypothermie, liegen weitere Angriffspunkte im Bereich der Membranstabilisierung, die den Zusammenbruch von Na^+-, K^+- und Ca^{++}-Pumpen verhindern sollen, sowie in der Anwendung von Puffersubstanzen, die die intrazelluläre Acidose des anaeroben Stoffwechsels ausgleichen. Da die Glykolyse die einzige Energiequelle während Anoxie und Ischämie darstellt, ist es von ganz besonderer Wichtigkeit für das Überleben der Zelle, daß der durch Stoffwechselumstellung in Gang gesetzte Glykolysefluß (Pasteur-Effekt) nicht wieder zum Still-

stand kommt.

Hierzu bestehen mehrere Ansatzpunkte:

1. Auswaschen des anfallenden Lactats.
2. Ausreichendes Substratangebot in Form von Glukose.
3. Aufrechterhaltung eines hohen NAD-Pools.

Wie von GUDBJARNASSON et al. (1970) gezeigt wurde, stoppt die Glykolyse, wenn durch Anhäufung von Lactat der intrazelluläre pH sinkt. Dieses Sistieren der Glykolyse läßt sich durch uneingeschränkten Lactatabtransport verhindern (SIESS und SEIFART, 1979), wodurch auch in Anoxie ein Energielevel aufrechterhalten werden konnte, das eine, wenn auch stark eingeschränkte, Kontraktilität zuließ. In diesem Sinne stellt auch die "multidose cardioplegia" (ENGELMANN et al., 1978) gegenüber der "singledose cardioplegia" wegen des Auswascheffektes die für die Herzerholung geeignetere Methode dar. Ebenfalls im Sinne des Ausgleichs von negativen Wirkungen der durch Glykolyse bedingten pH-Verschiebungen auf Enzymaktivitäten und Membranstruktur einerseits sowie Rückwirkungen auf den Glykolysefluß andererseits sind die Anwendung von Puffersubstanzen, wie THAM oder Histidin zu sehen (BRETSCHNEIDER et al., 1981). Da das pH-Optimum biochemischer Reaktionen der Myocardtemperatur umgekehrt proportional ist, wird unter Hypothermie von 15 - 20° C ein pH von 8.0 - 8.8 angestrebt (BUCKBERG, 1979).

Ein weiterer Angriffspunkt liegt in der Aufrechterhaltung genügend hoher NAD/NADH-Quotienten. Wie von DELABAR und SIESS (1979) gezeigt wurde, lassen sich durch Gabe von 50 µmol/l Nicotinsäure zur Inkubationslösung von Meerschweinchenherzvorhöfen unter aeroben Bedingungen die NAD-Spiegel als Zeichen echter Syntheseleistung signifikant erhöhen.

Glukose sollte im Bereich der Sättigung der Glykolysegeschwindigkeit gegeben werden, um nicht durch Substratmangel eine Verminderung der möglichen Energiegewinnung

zu bewirken. Dies ist durch Gabe von 15 mmol/l Glukose ausreichend gewährleistet (SEIFART, 1978).

Die Aufrechterhaltung eines genügend hohen Spiegels an energiereichen Phosphaten stellt das Grundprinzip aller Schutzmechanismen für die anoxische Herzzelle dar. So konnte von SIESS und SEIFART (1979) durch Zugabe von 100 µmol /l Adenin, 500 µmol/l Ribose, 50 µmol/l Nicotinsäure unter aeroben und anaeroben Bedingungen eine Erhöhung des Gesamtnukleotidpools um 30 %, des ATP-Spiegels um 45 % in isolierten Meerschweinchenherzvorhöfen bei 5-stündiger Inkubation erzielt werden. Nach 24 h Inkubation erhöhte sich der ATP-Spiegel um 78 % (DELABAR, 1979). Creatinphosphat konnte durch Zugabe von Creatin jedoch nicht erhöht werden.

Auch in unserem Versuchsaufbau wurde den bisherigen Überlegungen Rechnung getragen. Zur Inkubationslösung wurden Glukose sowie die Precursoren Adenin, Ribose, Nicotinsäure und Creatin zugesetzt. Auch wir konnten mit diesen Precursoren eine signifikante Erhöhung des AN-Pools und der ATP, ADP und NAD-Gewebekonzentrationen nach 5-stündiger Inkubation nachweisen (Abb. 4). Nach 3-stündiger Inkubation lagen die Gewebespiegel dieser Substanzen zwar über denen der Kontrollgruppen, waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Unter Anoxie stellten wir ebenfalls leicht erhöhte Werte für den AN-Pool, für ATP- und ADP-Spiegel fest, jedoch waren diese Unterschiede im Gegensatz zu Untersuchungen von SEIFART (1978), die bei 35° C Inkubationstemperatur durchgeführt wurden, nicht signifikant. Durch Inkubation mit Krebs-Henseleit-Lösung unter Zusatz von 15 mmol/l Glukose konnten jedoch auch unter Anoxie sowohl mit als auch ohne Precursorenzusatz Spiegel an energiereichen Phosphaten aufrechterhalten werden, die nur geringfügig unter den Werten unter Normoxie lagen. Lediglich CP fiel unter Anoxie stark ab. Dies soll nach Untersuchungen von KÜBLER und SPIECKERMANN (1970) und GUDBJARNASSON et al. (1970) bereits in den ersten

Minuten der Anoxie stattfinden. Der erst viel später beobachtete Abfall des ATP läßt sich durch Kompartimentierung der Zelle hinsichtlich des ATP- und CP-Pools sowie durch das Vorhandensein mehrerer Isoenzyme der Creatinkinase erklären. Unter Anoxie wird über eine Hemmung der Creatinkinase I durch Lactat und pH-Abfall der Transfer von mitochondrialem ATP zu CP verhindert; es besteht lediglich ein Gleichgewicht zwischen CP und Actomyosin-ATP (1 - 5 % des Gesamt-ATP-Pools), das im Cytosol durch Creatinkinase II aus dem CP-Pool aufgefüllt wird. Dieser erschöpft sich jedoch sehr schnell. Bei ansteigender ATP-Produktion durch Glykolyse wird der vermehrt anfallende Gehalt an energiereichen Phosphaten mittels einer Creatinkinase III nur zu einem geringen Teil als CP gespeichert. Die von uns gefundenen Gewebekonzentrationen des AN-Pools, des ATP, CP und NAD liegen noch in einem Bereich, in dem mit einer vollständigen Erholung der Zellfunktion nach Anoxie gerechnet werden kann. Ein Abfall des ATP-Spiegels von 60 % wird mit der Ausbildung von irreversiblen Schädigungen der Zelle in Zusammenhang gebracht (JENNINGS et al., 1978). Inwieweit die in unseren Versuchen zugegebenen Precursoren jedoch eine Schutzfunktion bei der Erholung der Zelle nach Anoxie ausüben können, läßt sich aus unseren Versuchen nicht sagen. Untersuchungen von ISSELHARD et al. (1977) und SCHRADER et al. (1977) zeigen, daß die Abbauprodukte der Adenosinnukleotide die Zelle leicht verlassen können, durch die zum Teil angewandten Techniken der Cardioplegie ausgewaschen werden und der Zelle dann zum Wiederaufbau der Nukleotide in der Erholungsphase unter Normoxie nicht mehr zur Verfügung stehen. Es erscheint uns deshalb gerechtfertigt, auch ohne signifikanten Nachweis einer Schutzwirkung der Precursoren unter Anoxiebedingungen, die Produkte des katabolen Stoffwechsels auch während dieser Phase zu geben, um durch Aufhebung des Konzentrationsgradienten einer Diffusion aus der Zelle entgegenzuwirken und so für die Erholungsphase genügend hohe Substratkonzentrationen zur Verfügung zu

stellen. Während REIBEL et al. (1978) keinen Effekt von Adenosin, ATP und CP-Gaben auf die postischämischen Adenosinnukleotidkonzentration feststellten, wurde von Mc DONALD et al. (1973) durch Zugabe von Inosin zu cardioplegischen Lösungen auch in der Erholungsphase sowohl ein erhöhter postischämischer Nukleotidspiegel als auch eine verbesserte Herzleistung im Vergleich zu Kontrollen festgestellt. Auch von HEARSE et al. (1976) wurde ein positiver Effekt der Adenosinnukleotidgabe zu cardioplegischen Lösungen auf die Herzerholung festgestellt, jedoch hielt er den Effekt im Vergleich zu dem anderer chemischer Protektionsmöglichkeiten für zu gering, um klinisch verwertet werden zu können.

Ein positiver Einfluß von Ribose auf die Herzfunktion und den ATP-Spiegel nach einer postischämischen normoxischen Erholungszeit wurde von PASQUE et al. (1981) gefunden. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen von ZIMMER et al. (1981), der allerdings einen positiven Effekt von Ribose auf den PRPP-Pool und den AN-Pool in der Erholungsphase nach Ischämie nur in solchen Organen nachweisen konnte, in denen die Basisadeninnukleotidsynthese niedrig ist, wie z. B. auch im Myocard.

Die Anwendung von Precursoren zur Verbesserung der Ischämietoleranz und zum Schutz der Zellintegrität scheint uns sowohl vor, während, als auch nach einer Ischämiephase ein sinnvoller Ansatzpunkt zur Gewährleistung vollständiger Erholung der Herzfunktion zu sein.

4.2. Einfluß von K^+ auf den Energiehaushalt der Herzzelle

Der Anwesenheit von K^+ in cardioplegischen Lösungen wird durch die Induktion eines sofortigen Herzstillstandes über eine Blockierung der Öffnung der schnellen Na^+-Kanäle und Verhinderung ischämischer Kontraktionen eine Konservierung zellulärer Energiereserven für strukturellen Gewebeschutz

und funktionelle Erholung zugesprochen (HEARSE et al., 1978). Darüberhinaus helfen Reagentien mit K^+ und Mg^{++}, einen der nachteiligsten Folgen der Gewebsischämie zu verhindern, nämlich den Verlust dieser Ionen sowie den Verlust von Enzymen aus der Zelle und verhindern so irreversible Zellschädigungen oder zögern sie zumindest hinaus.

Die Auswirkung von erhöhten extrazellulären K^+-Spiegeln auf den Metabolismus der Zelle wird in der Literatur sehr unterschiedlich dargestellt. COLLIN et al. (1980) fanden keinen Einfluß von Kaliumkonzentrationen zwischen 15 und 65 mmol/l per se auf den Metabolismus der untersuchten Gewebe, wohingegen andere Autoren einen Effekt von hohen K^+-Konzentrationen feststellen konnten. BONHOEFER (1967), NIEDERGERKE (1953), FREEMAN et al. (1965) sowie LANGER und BRADY (1968) beobachteten durch extrazelluläre K^+-Erhöhungen einen Anstieg der Zellatmung, der Wärmeproduktion und einen vermehrten Ca^{++}-Influx in Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur. Von REICH (1982) konnte ein Sauerstoffmehrverbrauch durch Kaliumerhöhung im Inkubationsmedium festgestellt werden, welcher Ca^{++}-abhängig war und durch Ca^{++}-freie Lösungen sowie durch Blockierung der langsamen Ca^{++}-Kanäle verhindert werden konnte.

Auch Arbeiten von FLECKENSTEIN (1972) am Froschmuskel zeigten, daß durch K^+-Depolarisation und erhöhte extrazelluläre Ca^{++}-Spiegel eine erhöhte Zellatmung und ein stärkerer Zerfall von Creatinphosphat verursacht werden. Dieser Effekt konnte durch Verwendung Calcium-freier Lösungen verhindert werden. Die Unterschiede im Sauerstoffverbrauch waren der Ca^{++}-Austauschbarkeit durch die Zellmembran direkt proportional und ließen sich durch Medikamente auf Normalwerte der Kontrollen reduzieren, die mit dem Ca^{++}-Fluß interferieren (NOVOTNY et al., 1962). CHALLONER (1968) fand, daß die Zellatmung in durch Kaliumdepolarisation ruhiggestellten Herzen weitgehend unabhängig von der oxidativen Phosphorylierung ablief, ob-

wohl der Hauptanteil des verbrauchten Sauerstoffs der Atmungskettenaktivität zugeschrieben werden konnte. Dies konnte mit Blockierungsversuchen durch Cyanid und Oligomycin gezeigt werden. Auch PENPARGKYL und SCHEUER (1969) untersuchten die Auswirkungen von Substanzen auf den Energiestoffwechsel durch K^+-Depolarisation bzw. Ca^{++}-Verarmung ruhiggestellter Herzen, die zum einen die oxidative Phosphorylierung entkoppelten und zum anderen den Elektronentransport in der Atmungskette blockierten. In ihren Versuchen hatte Oligomycin keinen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch, durch Dinitrophenol ließ sich der Verbrauch weiter steigern, durch Cyanid vollständig unterbinden. Von CHANCE und WILLIAMS (1956) wurden intrazelluläre Ca^{++}-Ionen im Überfluß als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung angesehen. Über diesen Mechanismus der intrazellulären Calciumerhöhung ließen sich auch viele Kaliumeffekte auf den Zellstoffwechsel erklären, d. h. durch den K^+-depolarisationsbedingten Ca^{++}-Einstrom durch die langsamen Calciumkanäle. Die Änderung des Gehaltes an energiereichen Phosphaten durch hohe Kaliumkonzentrationen könnte als Effekt zunehmender Calciumbindung und Pumpaktivität des sarcoplasmatischen Retikulums angesehen werden.

Es war Aufgabe dieser Arbeit festzustellen, ob mit der Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs von Meerschweinchenherzvorhöfen durch ansteigende Kaliumkonzentrationen im Inkubationsmedium auch ein erhöhter Aufbau an energiereichen Phosphaten durch oxidative Phosphorylierung verbunden ist. Unter Normoxiebedingungen konnte durch unsere Versuchsmethode auch mit hohen Kaliumkonzentrationen keine Änderung der Konzentration energiereicher Phosphate gegenüber den Kontrollwerten festgestellt werden. Auch eine Erhöhung des Energiequotienten ATP/ADP + AMP, die bei K_4 mit einer 100 %ig erhöhten O_2-Ruheverbrauchssteigerung eintreten müßte, blieb aus. Im Gegenteil, der Quotient liegt mit 5.9 gegenüber 7.2 eben noch im unteren Bereich der Vertrauensgrenze der Kontrolle. Jedoch wurde die normoxi-

sche Syntheseleistung durch Precursoren - erkennbar am nach 5 Stunden Inkubationszeit erhöhten Adenin- und Pyridinnukleotidgehalt der Herzmuskelzelle - durch K^+-Depolarisation sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig mit K_4 (65.9 mmol/l) bis zum Initialwert gehemmt. Dabei wurde auch der Energiequotient ATP/ADP + AMP durch K_4 von 6.8 $\pm$ 0.5 auf 4.3 $\pm$ 0.5 signifikant gesenkt. Mit 15.9 mmol/l K^+ ist der Energiequotient noch kompensiert. Eine Hemmung dieser Syntheseleistung kann eigentlich nur durch einen entkoppelten Effekt erklärt werden, da diese enzymatischen Reaktionen vom ATP/ADP + AMP-Quotienten abhängig sind (DELABAR, 1979) und jede Erhöhung der energieverbrauchenden Prozesse störend eingreift.

Unter Anoxiebedingungen ohne Precursorenzusatz kommt es ohne Depolarisation zu einem Absinken des ATP/ADP + AMP-Quotienten von 7.2 $\pm$ 0.4 auf 3.1 $\pm$ 0.3. Unter diesen Bedingungen sinkt ATP etwa von 100 % auf 70 %, steigt ADP und AMP ohne signifikanten Abfall des AN-Pools an, während CP auf ca. 10 % abfällt. NAD sinkt durch Reduktion zu NADH ab. Depolarisation mit 15.9 mmol/l K^+ ändert den Quotienten und den AN-Gehalt nicht. Zugabe von 65.9 mmol/l K^+ läßt den anoxischen Energiestoffwechsel zusammenbrechen: signifikanter Abfall des Energiequotienten auf 0.5, des AN-Gehaltes auf 33 %, des ATP auf 12 %, des NAD-Gehaltes auf 52 %, des CP-Gehaltes auf 4 % (Abb. 5, C_1 - K_4) als Zeichen irreversibler anoxischer Zellschädigung, verursacht durch die Depolarisation. Eine Reoxygenierung ist unter diesen energetischen Voraussetzungen sicher erfolglos. Als Ursachen dieser deletären Folgen der K^+-Depolarisation mit Konzentrationen von 65.9 mmol/l können Verschiebungen des pH zur sauren Seite, verbunden mit einer anoxischen Aktivierung der ATP-verbrauchenden K^+/Na^+-Pumpe angesehen werden. Wie stark hier weitere Steigerungen der energieverbrauchenden Prozesse in "salvage pathways" auf die Energiebilanz der Zelle einwirken, zeigt der Zusatz von Precursoren: Zur Kaliumaktivierung der Membranpumpen bei Anoxie kommen zusätzlich

noch Restitutionsversuche des enzymatischen Stoffwechsels in den salvage-pathways. Dennoch entgleist das anoxische Energiegleichgewicht bereits bei niedriger K^+-Konzentration (15.9 mmol/l). Die ohne Kaliumdepolarisation beobachtete Schutzwirkung dieser Precursoren auf AN- und NAD-gehalte unterbleibt, und die Energielage der Zelle wird im Gegenteil noch verschlechtert.

Die bisher aufgeführten Beobachtungen werden schon mit Kaliumkonzentrationen erreicht, wie sie heute noch in cardioplegischen Lösungen üblich sind. Um den durch K^+ verursachten Sauerstoffmehrverbrauch zu verhindern, müßte der Ca^{++}-Einstrom verhindert oder in Ca^{++}-freier Lösung zur Ruhigstellung des Herzens gearbeitet werden. Dies kann jedoch wieder dadurch zu Schwierigkeiten in der Erholungsphase des Myocards führen, daß bei der Reperfusion ein Calcium-Paradoxphänomen ausgelöst werden kann (WROGEMANN, 1976; RUIGROK, 1975; ZIMMERMANN et al., 1967). Eine Kaliumdepolarisation in Anoxie mit über 15.9 mmol/l K^+ scheint nach diesen Beobachtungen den anoxischen Energiestoffwechsel deletär zu beeinflussen und sollte vermieden werden.

4.3. Schlußfolgerungen und Ausblick

Die gegenwärtigen Versuche, möglichst effiziente cardioplegische Lösungen zu entwickeln, weisen in viele Richtungen. Wegen bereits genannter nachteiliger Wirkungen sowohl Calcium-freier Lösungen als auch durch K^+-Depolarisation verursachter erhöhter intrazellulärer Calcium-Spiegel laufen gegenwärtig Bestrebungen zur Ruhigstellung des Herzens mit Calciumantagonisten, mit Agentien, die die langsamen Ca^{++}-Kanäle blockieren sowie mit β-Blockern und Antiarrhythmika der Lokalanästhetikagruppe. Eine optimale Versorgung des Herzens mit Substraten der anaeroben Glykolyse, Auswaschung von Lactat bzw. Pufferung des pH-Abfalls unter Anoxie, Verhinderung des Verlustes von Abbauprodukten des Nukleotidstoffwechsels bzw. zur Verfügungstellen ausreichender Mengen an Grundstoffen für den Wiederaufbau

energiereicher Phosphate nach Ischämiephasen stellen sinnvolle Ansatzpunkte zum besseren Schutz der Herzzelle unter extremen Stoffwechselbedingungen und zur Verbesserung der Wiederbelebungsmöglichkeit dar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Während der K^+-Depolarisation bei Benutzung cardioplegischer Lösungen findet sich ein Ca^{++}-abhängiger Anstieg des Ruhesauerstoffverbrauchs um 10 % bei 15.9 mmol/l K^+-Lösung und um 100 % bei 65.9 mmol/l K^+-Lösung (STIELER et al., 1982).
   Um festzustellen, ob eine Entkopplung der Atmungskette durch diese Erhöhung des externen K^+ stattfindet, wurden ATP, ADP, AMP, AN-Pool, CP sowie NAD-Spiegel in ruhenden linken Meerschweinchenvorhöfen bestimmt und der Energiequotient ATP/(ADP + AMP) berechnet.

2. Die von uns untersuchten linken Herzvorhöfe wurden mit Krebs-Henseleit-Lösung + 15 mmol/l Glukose bei 30° C unter Normoxie (95 % O_2 + 5 % CO_2), pH 7.4, ohne und mit Precursoren (100 µmol/l Adenin, 50 µmol/l Nicotinsäure, 15 mmol/l Ribose, 5 mmol/l Creatin) in einer spezifischen Versuchsanordnung inkubiert. Zusätzlich wurde in den Versuchsgruppen mit und ohne Precursoren mit KCl 15.9 mmol/l, 35.9 mmol/l und 65.9 mmol/l (Endkonzentration) in der Inkubationslösung eine Depolarisation herbeigeführt.

3. Während 5-stündiger Inkubation in Normoxie ohne Precursoren blieben alle untersuchten Parameter gegenüber der 0 h Kontrolle unverändert. Eine entsprechend dem O_2-Verbrauchsanstieg erwartete Erhöhung des Energiequotienten blieb jedoch aus, dieser senkte sich bis zu der unteren Vertrauensgrenze. Durch Zusatz von Precursoren ohne Depolarisation wird nach 5 h Inkubation ein signifikanter Anstieg bei ATP +38 %, AN +39 % und NAD +34 % durch Neusynthese beobachtet; CP blieb unverändert.
   Durch Zugabe von 10 mmol/l K^+ wird diese Syntheseleistung vermindert und durch Zugabe von 60 mmol/l Kalium auf die normalen Werte unterdrückt, wobei der Energiequotient signifikant absinkt.

. Unter 2 h Anoxie, die einer Vorperiode von 3 h Normoxie nachfolgt, wird unter Versuchsbedingungen ohne Zugabe von Precursoren keine Abnahme des gesamten Nukleotidgehaltes gefunden. ATP sinkt dabei mit Erhöhung von ADP und AMP um 30 %, der Energiequotient fällt von 7.2 ± 0.4 auf 3.1 ± 0.3 ab. Es kommt außerdem zu einer Verschiebung von NAD (-25 %) zu NADH und einem Abfall von CP auf ca. 10 % der Kontrollwerte unter Normoxie, d.h. auf Werte, bei denen noch reduzierte Kontraktionsleistung des Herzmuskelgewebes über Stunden möglich ist.
Depolarisation mit niedrigen K^+-Konzentrationen verschlechtert dieses anoxische Energiegleichgewicht, das die Zelle lebensfähig hält, noch nicht signifikant. Kaliumkonzentrationen von 65.9 mmol/l führen hier jedoch zu einer deletären Energiebilanz: ATP sinkt signifikant um 88 %, AN-Pool um 67 %, CP um 96 %, NAD um 48 %, der Energiequotient von 3.1 (Anoxie ohne zusätzliches K^+) auf 0.5 ab.
Alle diese Werte sind mit dem Überleben der Zelle nicht vereinbar.
Zusätzliche anoxische Energieleistungen des Stoffwechsels durch Zugabe von Precursoren verschlechtern die Energiebilanz bereits bei niedrigen K^+-Konzentrationen (15.9 mmol/l). Die früher ohne K^+-Depolarisation beobachtete anoxische Schutzwirkung auf AN- und NAD-Gehalte tritt hier nicht ein und wird ins Gegenteil verkehrt: Der anoxische Energiequotient sinkt bereits bei 15.9 mmol/l K^+ signifikant ab.

. Die Ergebnisse in Normoxie können mit einer bei niedrigen K^+-Konzentrationen gerade noch kompensierten, bei hohen K^+-Konzentrationen aber nicht mehr kompensierbaren Entkopplung des Energiestoffwechsels erklärt werden.
Im anoxischen Energiegleichgewicht bei optimaler anaerober Glykolyse als einziger Energiequelle wirkt

sich eine zusätzliche Depolarisation mit 60 mmol/l K^+ möglicherweise über die anoxisch aktivierte K^+-Na^+-abhängige Membranpumpe deletär auf den Energiestoffwechsel aus; bei zusätzlicher Stoffwechselaktivierung mit Precursoren beginnt der Zusammenbruch des Energiestoffwechsels bereits bei Konzentrationen von 15.9 mmol/l.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BLEESE,N., DÖRING,V., GERCKEN,G., KALMARR,P., LIERSE,W., POKER,H., POLONIUS,M.J., STEINER,D. and RODEWALD, G.: Langzeitherzstillstand durch cardioplegische Coronarperfusion. Thoraxchirurgie 24, 468, (1976)

BLEESE,N., DÖRING,V., GERCKEN,G., KALMARR,P., LIERSE,W., POKER,H., POLONIUS,M.J., STEINER,D. and RODEWALD, G.: Intraoperative myocardial protection by cardioplegie in hypothermie. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 75, 405, (1978)

BONHOEFFER,V.K.: Der Sauerstoffverbrauch des normo- und hypothermen Hundeherzens vor und während verschiedener Formen des induzierten Herzstillstandes. Bibl.Cardiol. 18, 1-73, (1967)

BRAIMBRIDGE,M.V., CHAYEN,J., BITENSKY,L., HEARSE,D.J., JYNGE,P. and CANKOVIC-DARRACOTT,S.: Cold cardioplegie or continuos coronary perfusion. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 74, 900-906, (1977)

BRAZIER,J., HOTTENROTT,C., BUCKBERG,G.D.: Noncoronary collateral myocardial blood flow. Ann.Thor.Surg. 19, 426, (1975)

BRETSCHNEIDER,H.J., HUBNER,G., KNOLL,D., LOHR,B., NORDBECK,H. and SPIECKERMANN,P.G.: Myocardial resistence and tolerance to ischämie: physiological and biochemical basis. J.Cardiovasc.Surg. 16, 241, (1975)

BRETSCHNEIDER,H.J.: Myocardial protection. Thorac.Cardiovasc.Surg. 28, 295, (1980)

BRETSCHNEIDER,H.J., GEBHARD,M.M., PREUSSE,C.J.: Reviewing the pros and cons of myocardial preservation within cardiac surgery. In : Towards safer cardiac surgery Ed. E.D. Longmore MTP Press, Lancaster, p 13 (1981)

BUCKBERG,G.D.: A proposed solution to the cardioplegic controversy. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 77, 803, (1979)

CARAFOLI,E.: The role of Mitochondria in the Contraction Relaxation Cycle and other Ca^{++} dependent Activities of Heart Cells. In: Recent Advances in Studies of cardiac Structure and Metabolism. Vol. 5, p 159 - 163, (1975)

CARAFOLI,E.: The Transport of Calium across the Inner Membrane of Mitochondria. In: Membrane Transport of Calcium (Carafoli, E., Ed.) Academic Press (1982)

CHALLONER,D.R.: Respiration in myocardium. Nature 217, 78-79, (1968)

CHANCE,B., WILLIAMS,G.R.: The respiratory chain and phosphorylation. In: Advances in Enzymology, edited by FF Nord, New York, Interscience, Vol 17, p 116-118, (1956)

COLIN,L., GIBBS,W., DEMETRIOS,E., PAPADOYAMIS,A., DRAKE, J. and NOBLE,M.I.M.: Oxygen consumption of the non-working and potassium chlorid arrested Dog heart. Circ.Res. 47, 408-417, (1980)

DELABAR,U. and SIESS,M.: Synthesis and degradation of NAD in Guinea pig cardiac muscle I and II. Basic.Res. Cardiol. 74, 528-544, 572-593, (1977)

ENGELMANN,R.M., AUVIL,J., O'DONGHUE,M.J., LEVITSKY,S.: The significance of multidose cardioplegia and hypothermia in myocardial preservation during ischemic arrest. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 75, 555-563, (1978)

FOLETTE,D., STEED,D.L., FOGLIA,R., FEY,K. and BUCKBERG, G.D.: Advantages of intermittend blood cardioplegia over intermittend ischämia during prolonged hypothermic aortic clamping. Circulation 58, Suppl. 1, 200, (1978)

FREEMANN,S.E., PADDLE,B.M., GAY,W.S. and NAYLER,W.G.: Modifikation of metabolism, ionic content and resting potential in toad heart by high potassium solutions. Biochem.Biophys. Acta 100, 222-234, (1965)

GAY,W.S. and EBERT,P.A.: Functional, metabolic and morphological effects of prolonged potassium induced cardioplegia. Surg. 74, 287, (1973)

GAY,W.S.: Potassium induced cardioplegia. Ann.Thorac. Surg. 20, 95-100, (1975)

GUDBARNASSON,S., MATHES,R.G., RAVENS,R.G.: Functional compartimentation of ATP and CP in heartmuscle. J.Molec.Cell Cardiol. 1, 325-339, (1970)

GUDBARNASSON,S.: Acute alteration in energetics of ischämic heart muscle. Cardiology 56, 232-244, (1971)

HEARSE,D.J., STEWARD,D.A. and BRAIMBRIDGE,M.V.: Hypothermic arrest and potassium arrest, metabolic and myocardial protection during elective cardiac arrest. Circ.Res. 36, 481, (1975)

HEARSE,D.J., STEWARD,D.A. and BRAIMBRIDGE,M.V.: Cellular protection during myocardial ischämia. The development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischämic arrest. Circulation 54, 193, (1976)

HEARSE,D.J., STEWARD,D.A. and BRAIMBRIDGE,M.V.: Myocardial protection during ischämic cardiac arrest. Possible deleterious effects of glucose and manitol in coronary infusates. J.Thorac.Cardiovasc. Surg. 76, 16, (1978)

HEARSE,D.J., STEWARD,D.A. and BRAIMBRIDGE,M.V.: Myocardial protection during ischämic cardiac arrest. The importance of magnesium in cardioplegic infusates. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 75, 877, (1978)

HEARSE,D.J., HUMPFREY,S.M. and BULLOCK,G.R.: The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facets of the same problem? J.Mol.Cell.Cardiol. 10, 641, (1978)

HEARSE,D.J., O'BRIEN,K. and BRAIMBRIDGE,M.V.: Protection of the myocardium during ischämic arrest: dose response curves for procaine and lignocaine solutions. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 81, 873, (1981)

HEARSE,D.J., BRAIMBRIDGE,M.V. and JYNGE,P.: Protection of ischämic myocardium: Cardioplegie. Raven Press New York, (1981)

HÖLSCHER,B.: Studies by electron microscopy on the effects of magnesiumchloride, procainamide or potassiumcitrate on the myocardium in induced cardiac arrest. J.Cardiovasc.Surg., 8, 162, (1967)

ISSELHARD,W., REINEKE,H., EITENMÜLLER,J., HERB,H.G.: Erhöhung myocardialer Adeninukleotide durch Adenosin. Chirurgisches Forum für experimentelle und klinische Forschung, 17-20, (1977)

ISSELHARD,W., EITENMÜLLER,J., DeVREESE,A., REINEKE,H., CZERNIAK,A., SURZ,J., HERB,H.G.: Increase in myocardial adenine nucleotides induced by adenosine: Dosage, mode of application and duration, species differences. J.Mol.Cell.Cardiol. 12, 619, (1980)

ISSELHARD,W., SCHORN,B., HÜGEL,W., UEKERMANN,U.: Comparision of three methods of myocardial protection. Thorac.Cardiovasc.Surg. 28, 329-336, (1980)

JAWOREK,D., GRUBE,W., BERGMEYER,H.U.: Bestimmung von Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat. H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, Seite 2051, 2. Auflage (1970)

JENNINGS,R.B., HAWKINS,H.K., LOWE,J.E. et al.: Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischämia in the dog. Am.J.Pathol. 92, 187-217, (1978)

JYNGE,P., HEARSE,D.J., FEUVRAY,D., MUHALE,W., CANKOVIC-DARRACOTT,S., O'BRIEN,K. and BRAIMBRIDGE,M.V.: The St. Thomas Hospital cardioplegic solution: a characterization in two species. Scad.J.Thorac. Cardiovasc.Surg., Suppl. 30, (1981)

KIRSCH,U., RODEWALD,G. and KALMAR,P.: Induced ischämic arrest and clinical experience with cardioplegia in open heart surgery. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 63, 121, (1972)

KLINGENBERG,M. in: Methoden der enzymatischen Analyse H.U.Bergmeyer,Verlag Chemie, Weinheim, 1975 - 1990, (1970)

KREBS,H.A., HENSELEIT,K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seylers Z. Physiolog.Chem. 210, 33-60, (1932)

KÜBLER,W., SPIECKERMANN,P.G.: Regulation of Glycolysis in the Ischämic and the Anoxic Myocardium. J.Mol. Cell.Cardiol. 1, 351-377, (1970)

LAMPRECHT,W., STEIN,P., HEINZ,F., WEISSER,H.: Bestimmung von Creatinphosphat. In: H.U.Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, Seite 1729, 2. Auflage, (1970)

LAMPRECHT,W., TRAUTSCHOLD,I.: ATP-Bestimmung mit Hexokinase und Glukose-6-phosphatdehydrogenase. In: H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, Seite 2024, 2. Auflage (1970)

LANGER,G.A., BRADY,A.I.: The effect of temperature upon contraction and ion exchange in rabbit ventricular myocardium. J.Gen.Physiol. 52, 682-713, (1968)

LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., RANDALL,R.J.: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275, (1951)

McDONALD,T.F. and MacLEOD,D.: Metabolism and the electrical activity of anoxic ventricular muscle. J.Physiol. 229, 559-582, (1973)

MELROSE,D.G., DREYER,B., BENTALL,H.H. and BAKER,J.B.E.: Elective cardiac arrest. Lancet 2, 21, (1955)

MENSING,J.: Die Badmethode für isolierte Muskelpräparate Beiträge zu ihrer Geschichte und zur Weiterentwicklung für Versuche am Herzmuskel. Med. Inaug.Dissertation, Tübingen (1976)

NIEDERGERKE,R.: The potassiumchloride contracture of the heart and its modification by calcium. J.Physiol. London 134, 584-599, (1956)

NOVOTNY,I., VYSKOGIL,F., VYSGLICKY,L. and BERNANEK,R.: Potassium and caffeine induced increase of oxygen consumption in frog muscle and its inhibition by drugs. Physiol. Bohemoslov. 11, 277-284, (1962)

PENPARGKUL,S., SCHEUER,J.: Metabolic comparisions between hearts arrested by calcium deprivation or potassium arrest. Am.J.Physiol. 217 (5), 1405-1412, (1969)

PASQUE,M.K., THOMAS,M.D., SPRAY,L., GARY,M.D., PELLOM,L., PEYTON,R.B. et al.: Ribose enhanced myocardial recovery following ischämia in the isolated working rat heart. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 83, 390-398, (1982)

PREUSSE,C.J., GEBHARD,M.M., BRETSCHNEIDER,H.J.: Recovery of myocardial metabolism after a 210 minute cardiac arrest induced by Bretschneider cardioplegia. J.Mol.Cell.Cardiol. 11, Suppl. 2, 46, (1978)

PREUSSE,C.J., BRETSCHNEIDER,H.J. and GEBHARD,M.M.: Myocardial equilibration procedures during cardioplegic coronary perfusion. In : Proceedings Symposium Cardioplegia: The first Quater Century, London, p 97, (1980)

REIBEL,Diane K. and Michael J. ROVETTO: Myocardial ATP synthesis and mechanical function following oxygen deficiency. Am.J.Physiol.Heart circ.Physiol. 3, (5), H 620 - H 624, (1978)

REICH,I.: Untersuchungen zur Beeinflussung des Sauerstoffverbrauches isolierter Meerschweinchenherzvorhöfe durch Fettsäuren und durch Kaliumdepolarisation. Med. Inaugural Dissertation, Universität Tübingen, (1982)

RICH,T.L., BRADY,A.: Potassium contracture and utilisation of high-energy phosphates in rabbit heart. Am.J.Physiol. 1, (1974)

ROE,B.B., HUTCHINSON,J.C., FISHMANN,N.H., ULLJOT,D.J. and SMITH,D.L.: Myocardial protection with cold ischämic potassium induced cardioplegia. J.Thorac. Cardiovasc.Surg. 73, 366, (1976)

ROVETTO,M.J., WHITMER,J.T., NEELY,J.R.: Comparision of the effects of anoxia and whole heart ischämia on carbohydrat utilisation in isolated Rat hearts. Circ.Res. 132, 699, (1973)

RUIGROK,T.B.C., BURGERSDISK,J.A.: The calcium paradox - A reaffimation. Eur.J.Cardiol. 3, 59, (1975)

SCHRADER,J., HADDY,F.S., GERLACH,E.: Release of adenosine, inosine and hypoxänthine from the isolated guinea pig heart during hypoxic flow autoregulation and reactive hyperemia. Pflügers Arch. 369, 1, (1977)

SEIFART,H.I., DELABAR,U., SIESS,M.: The influence of various Precursors on the concentration of Energy-rich Phosphates and Pyridine Nucleotides in Cardiac Tissue and its possible Meaning for Anoxic Survival. Basic Res.Cardiol. 75, 5711, (1980)

SEIFART,H.I.: Funktionelle und biochemische Untersuchungen zur Anoxietoleranz des Herzmuskels und ihre pharmakologische Beeinflußbarkeit. Dissertation Universität Tübingen, (1978)

SIESS,M., MENSING,H.I., STIELER,K.: Investigations about the determination of the myocardial oxygen consumption. In: Symposium on Pharmacology of the heart, Eds. I. Knoll, L. Szerkeres and G.Y. Papp Akademiai Kiado, Budapest, p 65-73, (1976)

SIESS,M. and SEIFART,H.J.: Anoxic energy production and contractile activity in mammalian cardiac muscle. Advances in Myocardiology, Vol 2, Baltimore, Ed. Tajudin,M., Bhatta,B., Siddiqui,H.H., Rona,G. (1979)

SIESS,M., STIELER,K. and SEIFART,H.I.: The effect of AR-L 115 BI on function and oxygen consumption of isolated guinea pig atria as compared to ouabain and theophylline. Arzneimittelforschung (Drug Research) 31, (1), 1a, p 165-170, (1981)

SIESS,M.: Influences on the mitochondrial function of cardiac tissue. In: Cardiac Structure and Metabolism, K.Hosono and M.Nagano Eds., Publishers: Roppo shuppan-sha, Tokyo, (1983), 1

SIESS,M. and STIELER,K.: Methods for studying mitochondrial function in superfused cardiac muscle preparations. In: Methods in studying Cardiac Membranes, Vol 1, N.S. Dhalla Ed., CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, (1984), 87

STIELER,K., REICH,I. and SIESS,M.: The increase of resting O_2-consumption of guinea pig atria due to depolarization with rising KCl-Concentrations in dependence of Ca^{2+} and Nifedipine. N.S.Arch.Pharmacol.Suppl. Vol 319, 140, R 35, (1982)

WINNE,D.: Unstirred layer, Source of biased Michaelis constant in Membrane Transport. Biochem.Biophys.Act. 298, 27-31, (1973)

WINNE,D.: Zur Auswertung von Versuchsergebnissen. Arzneimittelforschung 14, 62-68, (1964)

WINNE,D.: Zur Planung von Versuchen. Wieviel Versuchstiereinheiten. Arzneimittelforschung 18, 1611-1618, (1968)

WOLLENBERGER,A., RISTAN,O., SCHOFFA,G.: Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung großer Gewebestükke. Pflügers Archiv Ges.Physiol. 270, 399-412, (1960)

WROGEMANN,K., PENA,S.D.J.: Mitochondrial Calcium overload. A General Mechanism für Cell-Necrosis in Muscle Disease. The Lancet, I March 27, p 672-673, (1976)

ZIMMER,H.G., STEINKOPF,G., IBEL,H., MARTIUS,P. and SAGSTETTER,M.: Effect of ribose and adenine nucleotide biosynthesis in rat hearts during post asphyctic recovery and after coronary artery ligation. Pflügers Arch. 389, R, (1981)

ZIMMERMANN,A.N.E., DAENS,W., HÜLSMAN,W., SNJDER,J., WISSE, E., DURRER,D.: Morphological changes of heart muscle caused by successive perfusion with calcium-free and calcium containung solutions (calcium paradox). Cardiovasc.Res. 1, 201, (1967)

7. VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

		Seite
Tab. 1:	Klinisch verwendete cardioplegische Lösungen	4
Tab. 2:	K^+-Depolarisation, O_2-Verbrauch und diastolische Spannung von ruhenden linken Herzvorhöfen des Meerschweinchens.	7
Tab. 3:	Proteinkonzentrationen, Extinktionen (Mittelwerte), mittlere Abweichungen der Mittelwerte und Versuchsanzahl der Proteinbestimmungen	28
Tab. 4:	Mittelwerte und mittlere Abweichungen der Mittelwerte unter Normoxie, 3 h O_2, Inkubation bei 30° C ohne Precursoren	33
Tab. 5:	Mittelwerte und mittlere Abweichungen der Mittelwerte unter Normoxie, 5 h O_2, Inkubation bei 30° C ohne Precursoren	36
Tab. 6:	Mittelwerte und mittlere Abweichungen der Mittelwerte unter Normoxie, 3 h O_2 und 5 h O_2, Inkubation bei 30° C mit Precursoren	39
Tab. 7:	Mittelwerte und mittlere Abweichungen der Mittelwerte unter Anoxie, 3 h O_2 und 2 h N_2, Inkubation bei 30° C ohne Precursoren	44
Tab. 8:	Mittelwerte und mittlere Abweichungen der Mittelwerte unter Anoxie, 3 h O_2 und 2 h N_2, Inkubation bei 30° C mit Precursoren	48

		Seite
Abb. 1:	Proteineichkurve	28
Abb. 2:	ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Normoxie, 3 h Inkubation ohne Precursoren	32
Abb. 3:	ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Normoxie, 5 h Inkubation ohne Precursoren	35
Abb. 4:	ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Normoxie, 3 h und 5 h Inkubation mit Precursoren	38
Abb. 5:	ATP/(ADP + AMP)-Quotient der Versuchsgruppen unter Normoxie und Anoxie, 5 h Inkubation mit und ohne Precursoren. Angabe von Mittelwerten, mittleren Abweichungen der Mittelwerte und Signifikanzgrenzen	41
Abb. 6:	ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Anoxie, 3 h O_2 + 2 h N_2 Inkubation ohne Precursoren	43
Abb. 7:	ATP, AN-Pool, CP, ADP, AMP und NAD-Gehalte unter Kontrollbedingungen und K^+-Depolarisation unter Anoxie, 3 h O_2 + 2 h N_2 Inkubation mit Precursoren	47

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AN-Pool	Adeninnucleotid-Pool
ATP	Adenosintriphosphat
C	Kontrollversuch
Ca	Calcium
CK	Creatinkinase
E	Extinktion
G-6-P	Glukose-6-phosphat
G-6-P DH	Glukose-6-phosphatdehydrogenase
Glu	Glukose
h	Stunden (hours)
HK	Hexokinase
K	Kalium
K.H.-Lösung	Krebs-Henseleit-Lösung
LDH	Lactatdehydrogenase
MK	Myokinase
n	Versuchsanzahl
N	Normalität
N_2	Stickstoff
Na	Natrium
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduz.
O_2	Sauerstoff
p	Wahrscheinlichkeit
P	Versuche mit Precursoren
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
Prec	Precursoren
PRPP	5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
RP	Ruhepotential

Lebenslauf

Daten zur Person:	Nikolaus Zeitler	
	geboren am 06.12.1953 in Osterburken	
	Eltern:	Alois Zeitler, Diplomlandwirt
		Katharina Zeitler, geb. Demand
	verheiratet seit 11.06.1982	
	mit Maren Zeitler, geb. Hagge, Diplombiologin	
	Kinder:	Nils Hendrik Zeitler,
		geboren am 16.05.1983
		Sören Niklas Zeitler,
		geboren am 16.08.1985
Schulbildung:	1960-1964	Grundschule Neckarbischofsheim
	1964-1965	Progymnasium Neckarbischofsheim
	1965-1972	Burghardt-Gymnasium Buchen
	06/1972	Abitur
Grundwehrdienst:	01.10.1972-	in Walldürn
	31.12.1973	Pz.Art.Btl. 3/365
Studium:	1973-1979	Studium der Biologie an der Universität Stuttgart-Hohenheim
	04.07.1979	Diplom im Fach Biologie
	1978-1984	Studium der Humanmedizin an den Universitäten Berlin, Mainz und Tübingen
	17.04.1984	Ärztliches Staatsexamen
	31.05.1984	Ärztliche Approbation
Berufstätigkeit:	Seit dem 01.06.1984 Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses in Stade	